

UNIVERSITE PAUL VALERY – MONTPELLIER III
Arts et Lettres, Langues et Sciences Humaines et Sociales

UFR 3 : Sciences Humaines et Sciences de l'Environnement

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PAUL VALERY – MONTPELLIER III
Spécialité : Biologie des Populations et Ecologie

Thèse présentée et soutenue publiquement le 21 décembre 2000

par

Thomas GUILLOUX

**ETUDE DE LA VARIABILITE BIOLOGIQUE, BIOCHIMIQUE ET GENETIQUE
DE POPULATIONS D'ORIGINES GEOGRAPHIQUES DIFFERENTES DE
COTESIA PLUTELLAE (KURDJUMOV) (HYMENOPTERA : BRACONIDAE),
PARASITOÏDE DE LA TEIGNE DES BRASSICACEES
PLUTELLA XYLOSTELLA (L.) (LEPIDOPTERA : YPONOMEUTIDAE)**

Sous la direction de
*** Jean-Pierre LUMARET, Professeur**

MEMBRES DU JURY :

M. ALAUZET C., Professeur, Université Paul Sabatier, Toulouse (rapporteur)
M. BORDAT D., Chercheur, CIRAD, Montpellier
M. DREZEN J. M., Chercheur CNRS, Université de Tours
M. DUVALLET G., Professeur, Université Montpellier III
M. GRENIER S., Directeur de Recherche, INRA/INSA de Lyon (rapporteur)
M. KIRK A., Chercheur USDA, Montpellier
M. LUMARET J. P., Professeur, Université Montpellier III

UNIVERSITE PAUL VALERY – MONTPELLIER III
Arts et Lettres, Langues et Sciences Humaines et Sociales

UFR 3 : Sciences Humaines et Sciences de l'Environnement

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PAUL VALERY – MONTPELLIER III
Spécialité : Biologie des Populations et Ecologie

Thèse présentée et soutenue publiquement le 21 décembre 2000

par

Thomas GUILLOUX

**ETUDE DE LA VARIABILITE BIOLOGIQUE, BIOCHIMIQUE ET GENETIQUE
DE POPULATIONS D'ORIGINES GEOGRAPHIQUES DIFFERENTES DE
COTESIA PLUTELLAE (KURDJUMOV) (HYMENOPTERA : BRACONIDAE),
PARASITOÏDE DE LA TEIGNE DES BRASSICACEES
PLUTELLA XYLOSTELLA (L.) (LEPIDOPTERA : YPONOMEUTIDAE)**

Sous la direction de

Jean-Pierre LUMARET, Professeur

MEMBRES DU JURY :

M. ALAUZET C., Professeur, Université Paul Sabatier, Toulouse (rapporteur)
M. BORDAT D., Chercheur, CIRAD, Montpellier
M. DREZEN J. M., Chercheur CNRS, Université de Tours
M. DUVALLET G., Professeur, Université Montpellier III
M. GRENIER S., Directeur de Recherche, INRA/INSA de Lyon (rapporteur)
M. KIRK A., Chercheur USDA, Montpellier
M. LUMARET J. P., Professeur, Université Montpellier III

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier en premier lieu M. Jean-Pierre LUMARET, Directeur du laboratoire de Zoogéographie à l'Université Paul Valéry, pour avoir accepté la direction de ma thèse.

Je remercie tout particulièrement M. Dominique BORDAT, chercheur au Laboratoire d'Entomologie Tropicale au CIRAD/AMIS, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire durant ma thèse, pour ses conseils et pour toute l'aide qu'il a pu m'apporter au cours de ces années de travail sous sa responsabilité.

Je suis reconnaissant à M. Claude ALAUZET, Professeur à l'Université Paul Sabatier à Toulouse et à M. Simon GRENIER, Directeur de Recherche à l'INRA/INSA de Lyon pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

J'exprime ma reconnaissance envers M. Jean-Michel DREZEN, chercheur à l'IRBI, à l'Université François Rabelais à Tours, pour m'avoir fait découvrir l'étonnante symbiose entre les guêpes parasitoïdes et leurs virus et pour m'avoir aidé au cours de ma thèse dans l'étude de ces interactions.

Je remercie encore M. Alan KIRK, chercheur à l'USDA à Montpellier, pour son aide précieuse, notamment la collecte de populations d'insectes qui m'ont servi de matériel d'étude dans le cadre de mon travail.

Merci aussi à M. Gérard DUVALLET, Professeur au laboratoire de Zoogéographie à l'Université Paul Valéry pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

J'exprime ma gratitude envers Mme Rose Gomes MONNERAT, chercheur à l'Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia à Brasília, pour m'avoir accueilli et encadré tout au long de mon séjour au Brésil. Je remercie également Mme Marina CASTELO-BRANCO et M. Félix FRANCA, chercheurs à l'Embrapa-Hortaliças, pour leur soutien au cours de mes travaux d'échantillonnage des populations de *Plutella xylostella* et de ses parasitoïdes durant cette période, ainsi que M. Edison SUJII, chercheur à l'Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia pour son aide à l'interprétation des résultats.

Je remercie de la même façon M. Jean-François VAYSSIERES, chercheur au CIRAD à la Réunion pour son accueil et ses conseils tout au long de mon séjour, ainsi que MM. André HOAREAU et Marie-Ludders MOUTOUSSAMY, techniciens du même laboratoire et encore M. François DAL, Volontaire à l'Aide Technique, pour leur aide durant le déroulement de mes expérimentations.

Merci encore à M. Gérard DELVARE, Directeur du Laboratoire de Faunistique du CIRAD, pour l'identification des nombreux spécimens de parasitoïdes que je lui ai confié, ainsi qu'à MM. Henri-Pierre ABERLENC et Jean-Michel MALDES, techniciens du même laboratoire, pour cette passion de l'entomologie que je partage avec eux.

Je voudrais encore remercier MM. Didier THARREAU, chercheur au CIRAD/CA et Eric de STORDEUR, chercheur au laboratoire de Zoogéographie pour leur aide précieuse lors de l'interprétation des résultats de mes analyses biochimiques, ainsi que M. Eric GOZE, statisticien au CIRAD pour tous ses conseils sur l'interprétation de mes données de terrain et enfin M. Jean-Louis NOYER, chercheur en virologie au CIRAD pour son appui technique lors de l'étude des Polydnavirus de *Cotesia plutellae*.

Merci encore à Daniel GARGANI, technicien au CIRAD/CP, pour la réalisation des coupes microscopiques de ces mêmes polydnavirus et pour les photographies qu'il a pu réaliser.

Je tiens aussi à exprimer mes remerciements à Mlles Laurence ARVANITAKIS et Christine PAGES, à M. Christophe TERTOIS, techniciens au laboratoire d'Entomologie Tropicale au CIRAD/AMIS, ainsi que Mlle Apolline PICHON, doctorante, pour leur aide précieuse, leur accueil et toute la sympathie qu'ils ont pu m'exprimer tout au long de ma thèse.

Finalement, j'exprime ma gratitude à tous les collègues et amis qui m'ont soutenu durant ces années.

I : INTRODUCTION	9
CHAPITRE II : ORGANISMES ÉTUDIÉS	17
II.1 - <i>Plutella xylostella</i> (L.) ou teigne des Brassicacées	19
II.1.1 - Systématique	19
II.1.2 - Situation géographique	19
II.1.3 - Description	20
II.1.4 - Biologie	27
II.1.4.1 - Nourriture	27
II.1.4.2 - Développement	27
II.1.5 - Lutte contre <i>Plutella xylostella</i>	30
II.1.5.1 - Lutte chimique	30
II.1.5.2 - Autres méthodes de lutte	32
II.2 - La lutte biologique	35
II.3 - <i>Cotesia plutellae</i> (Kurdjumov)	42
II.3.1 - Systématique	42
II.3.2 - Situation géographique	43
II.3.3 - Description	44
II.3.4 - Biologie	47
II.3.4.1 - Comportement reproducteur	47
II.3.4.2 - Développement	53
II.3.5 - Elevage de <i>Cotesia plutellae</i>	54
II.4 - <i>Cotesia plutellae</i>, espèce unique ?	58
II.4.1 - Introduction	58
II.4.2 - Protocole	60
II.4.3 - Résultats	60
II.4.4 - Discussion	61
CHAPITRE III : VARIABILITÉ BIOLOGIQUE : ETUDES SUR LE TERRAIN	65
III.1 – Introduction	67
III.2 – Matériel et méthodes	67
III.2.1 - Pratiques culturales :	67
III.2.2 - Echantillonnage :	68
III.2.3 - Mesures	68
III.2.3.1 - Enregistrement de données météorologiques :	68
III.2.3.2 - Analyses statistiques	68
III.3 - Brésil	69
III.3.1 - Introduction	69
III.3.2 - La zone d'expérimentation	70
III.3.3 - Résultats et discussion	75
III.3.3.1 - Les ravageurs du chou	75
III.3.3.2 - Les ennemis naturels du ravageur	80
III.3.3.3 - Les hyperparasites	88
III.4 - Ile de la Réunion	91
III.4.1 - Introduction	91
III.4.2 - Résultats et discussion	95
III.4.2.1 - Les ravageurs du chou	95
III.4.2.2 - Les ennemis naturels de <i>Plutella xylostella</i>	100
III.4.2.2 - Hyperparasites	107
III.5 - Perspectives	108

CHAPITRE IV : ANALYSES BIOCHIMIQUES : POLYMORPHISME ENZYMATIQUE	111
IV.1 - Matériel biologique utilisé	113
IV.2 - L'électrophorèse sur gels d'acétate de cellulose	113
IV.3 - Protocole	114
IV.3.1 - Extraction	114
IV.3.2 - Dépôt des échantillons et migration	115
IV.3.3 - Révélation	116
IV.4 - Résultats et discussion	119
IV.4.1 - Recherche de systèmes polymorphes	119
IV.4.2 - Caractérisation des populations	123
IV.4.3 - Analyse statistique	123
CHAPITRE V : VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE : LE POLYDNAVIRUS SYMBIOTE DE COTESIA PLUTELLAE	129
V.1 - Introduction : immunité des insectes et parades des parasitoïdes	131
V.2 - Les polydnavirus	133
V.3 - Détection d'un polydnavirus chez <i>Cotesia plutellae</i>	136
V.4 - Microscopie électronique	136
V.4.1 – Préparation des échantillons	136
V.4.2 - Résultats	137
V.4.2.1 - <i>Cotesia plutellae</i>	137
V.4.2.2 - <i>Microplitis plutellae</i>	138
V.5 - Le polymorphisme du polydnavirus chez <i>C. plutellae</i>	138
V.5.1 - Introduction	138
V.5.2 - Extraction de l'ADN viral et visualisation	143
V.5.3 - Résultats	144
V.5.3 – Discussion	151
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	155
BIBLIOGRAPHIE	161
ANNEXES	193

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Carte 1 : Aire de répartition de <i>Plutella xylostella</i> (L.)	21
Carte 2 : Aire de répartition de <i>Cotesia plutellae</i> (Kurjumov)	45
Carte 3 : Introductions recensées de <i>Cotesia plutellae</i>	46
Carte 4 : Région de Brasília-DF, avec localisation des centres de recherche de l'Embrapa-Cenargen et de l'Embrapa-Hortaliças	71
Carte 5 : Région de Saint-Pierre (île de la Réunion) avec l'emplacement des parcelles d'expérimentations et la zone de collecte de Montvert-Les-Hauts	93
Figure 2-1 : <i>Plutella xylostella</i> (L.)	23
Figure 2-2 : <i>Cotesia plutellae</i> (Kurjumov)	49
Figure 2-3 : Appareil génital femelle de <i>Cotesia plutellae</i>	55
Figure 2-4 : Cage d'élevage pour <i>Plutella xylostella</i> et <i>Cotesia plutellae</i>	56
Figure 3-1 : Paysage de cerrados brésiliens, après le retour des pluies	72
Figure 3-2 : Parcelles 1 et 2 à l'Embrapa-Hortaliças, en juillet 1998	72
Figure 3-3 : Courbe cumulée des populations de <i>Plutella xylostella</i> pendant la première culture sur les parcelles de l'Embrapa-Hortaliças	77
Figure 3-4 : Evolution temporelle des populations de <i>Plutella xylostella</i> sur les parcelles de l'Embrapa-Hortaliças	78
Figure 3-5 : <i>Plutella xylostella</i> et ses principaux parasitoïdes rencontrés à l'Embrapa-Hortaliças	81
Figure 3-6 : Répartition temporelle des principaux parasitoïdes échantillonnés sur les parcelles de l'Embrapa-Hortaliças	86
Figure 3-7 : Parcelles de Bras de Pontho et Piton Hyacinthe	94
Figure 3-8 : Courbe cumulée des populations de <i>Plutella xylostella</i> sur les parcelles de l'île de la Réunion	97
Figure 3-9 : Distribution temporelle de <i>Plutella xylostella</i> et de ses principaux parasitoïdes sur les parcelles de la Réunion	98
Figure 4-1 : Schéma d'une cuve à électrophorèse sur gels d'acétate de cellulose, en fonctionnement	117
Figure 4-2 : Quelques résultats d'électrophorèse : exemples de révélation de gels d'acétate de cellulose pour les enzymes ME, PGDH, MPI, PEP Phe-Ala et PGM	121
Figure 4-3 : Révélation de l'enzyme IDH sur gel d'amidon pour trois populations de <i>Cotesia plutellae</i> étudiées	122
Figure 4-4 : Arborescence des distances génétiques calculées pour les cinq populations de <i>Cotesia plutellae</i>	125
Figure 5-1 : Diagramme schématique des points possibles de régulation du système immunitaire de l'hôte par le parasitoïde, le polydnavirus, les protéines ovariennes, le venin et autres facteurs	135
Figure 5-2 : Coupe transversale d'un calice ovarien de <i>Cotesia plutellae</i> et localisation des polydnavirus	139
Figure 5-3 : Polydnavirus de <i>Cotesia plutellae</i>	140
Figure 5-4 : Polydnavirus de <i>Microplitis plutellae</i>	141
Figure 5-5 : RFLP du polydnavirus de <i>Cotesia plutellae</i> à l'aide de différentes enzymes de restriction	147
Figure 5-6 : Exemples de profil RFLP obtenus par trois enzymes de restriction sur l'ADN viral provenant de <i>Cotesia plutellae</i>	148
Figure 5-7 : Variabilité individuelle et interpopulationnelle de CpPDV révélée par Eco RI et Hind III	149

Tableau 1-1 : Production de Brassicacées dans le monde en 1999 (FAO, 2000)	12
Tableau 2-1 : Durée de développement de <i>Plutella xylostella</i> à 20 °C	27
Tableau 2-2 : Quelques valeurs de la fécondité dans diverses populations de <i>Plutella xylostella</i>	29
Tableau 2-3 : Exemples de cas de résistance aux insecticides chez <i>Plutella xylostella</i>	31
Tableau 2-4 : Principales espèces d'Hyménoptères parasitoïdes observées chez <i>Plutella xylostella</i>	37
Tableau 2-5 : Cas recensés d'introductions pour les parasitoïdes de <i>Plutella xylostella</i> (<i>Diadegma</i> spp., <i>Diadromus collaris</i>, <i>Cotesia plutellae</i> et <i>Oomyzus sokolowskii</i>)	38
Tableau 2-6 : Résultats obtenus lors des croisements entre populations de <i>Cotesia plutellae</i>	63
Tableau 3-1 : Données météorologiques (moyennes mensuelles) relevées par la station de l'Embrapa-Hortaliças (année 1998)	70
Tableau 3-2 : Taux de parasitisme hebdomadaires dans les populations de <i>Plutella xylostella</i> échantillonnées à l'Embrapa-Hortaliças	79
Tableau 3-3 : Parasitoïdes observés sur les populations de <i>Plutella xylostella</i> au Brésil	82
Tableau 3-4 : Préférences alimentaires de <i>Diadegma leontinae</i> sur les stades L2 à L4 des chenilles de <i>Plutella xylostella</i> au Brésil	84
Tableau 3-5 : Préférences alimentaires d'<i>Apanteles piceotrichosus</i> sur les stades L2 à L4 des chenilles de <i>Plutella xylostella</i> au Brésil	84
Tableau 3-6 : Détail d'une semaine d'échantillonnage (douzième semaine, parcelle 2). Taux de parasitisme par <i>Apanteles piceotrichosus</i> pour chaque stade larvaire	84
Tableau 3-7 : Nombre moyen de parasitoïdes observés sur <i>Plutella xylostella</i> dans les échantillonnages hebdomadaires de choux sur les parcelles de l'Embrapa-Hortaliças (Brésil)	87
Tableau 3-8 : Hyperparasites présents sur les deux principaux parasitoïdes de <i>Plutella xylostella</i> (Brésil)	90
Tableau 3-9 : Données météorologiques (moyennes mensuelles) relevées par les stations des parcelles à la Réunion (année 1999)	92
Tableau 3-10 : Rendement des parcelles expérimentales à la Réunion	99
Tableau 3-11 : Ravageurs observés sur les parcelles d'étude de la Réunion	101
Tableau 3-12 : Parasitoïdes observés sur les populations de <i>Plutella xylostella</i> à la Réunion	102
Tableau 3-13 : Préférences alimentaires de <i>Diadegma</i> sp. sur les stades L2 à L4 des chenilles de <i>Plutella xylostella</i> à la Réunion	105
Tableau 3-14 : Préférences alimentaires de <i>Cotesia plutellae</i> sur les stades L2 à L4 des chenilles de <i>Plutella xylostella</i> à la Réunion	105
Tableau 3-15 : Nombre moyen de parasitoïdes observés sur <i>Plutella xylostella</i> dans les échantillonnages hebdomadaires de choux sur les parcelles de la Réunion	106
Tableau 3-16 : Taux global de parasitisme observé sur les trois parcelles de la Réunion	106
Tableau 4-1 : Systèmes enzymatiques testés chez <i>Cotesia plutellae</i>	118
Tableau 4-2 : Fréquences alléliques dans les systèmes et populations étudiés	124
Tableau 4-3 : Différenciation génétique des populations de <i>Cotesia plutellae</i>	124
Tableau 5-1 : Enzymes de restriction testées sur le polydnavirus de <i>Cotesia plutellae</i>	146

I : INTRODUCTION



Les Brassicacées sont à l'origine de quelques-unes des plus grandes cultures alimentaires de la planète, développées sur une superficie de trente millions d'hectares, avec une production annuelle globale de 105 millions de tonnes (pour les choux, les choux-fleurs et le colza) (FAO, 2000) (tableau 1-1). Les deux tiers de cette production sont localisés en Asie, où ces légumes représentent parfois la source alimentaire principale des populations. Les déprédateurs de ces cultures représentent donc un problème dont l'ampleur est à la mesure de l'importance de ces Brassicacées pour l'homme.

Au premier rang de ces ravageurs se situe la teigne des Brassicacées *Plutella xylostella* (Linné, 1758). Ce papillon, inféodé à cette famille végétale, est susceptible d'infliger de sévères dégâts dans les champs attaqués si on ne traite pas rapidement les parcelles touchées (Talekar & Shelton, 1993). Les traitements chimiques à base d'insecticides synthétiques restent le principal moyen de lutte contre *P. xylostella* mais cet insecte est doté de grandes capacités d'adaptation au point de présenter actuellement des résistances à toutes les familles de produits existants (Cheng, 1988), y compris les régulateurs de croissance (Insect Growth Regulator = IGR, perturbant les mues des insectes) ou les biopesticides à base de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (ou "Bt") (Tabashnik *et al.*, 1990 ; McGaughey & Whalon, 1992 ; Sanchis *et al.*, 1995). Cette course entre les agriculteurs et le ravageur conduit à l'augmentation incessante des doses de produits, à la fabrication de mélanges ou à la recherche de nouveaux produits encore plus efficaces. Dans tous les cas l'agriculteur subit des pertes financières, à cause du coût de ces traitements, souvent 30 à 50 % du prix de revient de la culture (Lim, 1986), ou parce que le taux de résidus de pesticides dans la récolte la rend impropre à la consommation (Nakahara *et al.*, 1986).

Il devient donc nécessaire de trouver des méthodes alternatives permettant de maintenir le contrôle des populations de *P. xylostella* sans présenter les problèmes environnementaux des insecticides (Tabashnik *et al.*, 1987). La tendance est actuellement à la lutte intégrée, combinant l'utilisation des nombreux ennemis naturels du papillon avec des traitements insecticides modérés si les premiers sont insuffisants, l'ensemble permettant de réduire les dégâts à un niveau économiquement acceptable pour les agriculteurs.

Parmi ces ennemis naturels on utilise surtout les parasitoïdes de *P. xylostella*. Le plus répandu d'entre eux est le petit hyménoptère *Cotesia plutellae* (Kurdjumov, 1912) (Hym. : Braconidae), qui a suivi son hôte à peu près partout dans le monde, essentiellement à la suite de nombreuses introductions.

Tableau 1 : Production de Brassicacées dans le monde en 1999 (FAO, 2000)

Production (en tonnes)

	Monde	Asie	Europe	Amérique du Nord
Choux	49 205 018	33 238 033	3 032 515	2 285 000
Choux-fleurs	13 810 238	10 407 558	1 963 853	294 500
Colza	42 235 045	16 037 345	11 338 2745	9 274 000

Surface récoltée (en hectares)

	Monde	Asie	Europe	Amérique du Nord
Choux	2 292 097	1 559 226	116 172	93 817
Choux-fleurs	777 386	558 530	121 727	21 090
Colza	27 059 254	14 218 570	3 518 658	5 977 220

<u>Rendements globaux :</u>	- Choux	21,5 t/ha
	- Choux-fleurs	17,8 t/ha
	- Colza	1,6 t de graines/ha

Quoique *C. plutellae* soit considéré comme un parasitoïde efficace dans la lutte contre *P. xylostella*, les taux de parasitisme observés varient fortement selon la zone géographique étudiée (Talekar & Yang, 1991 [Taïwan] ; Monnerat, 1995 [Brésil] ; Bordat & Goudegnon, 1997 [Bénin] ; Waladde *et al.*, 1999 [Afrique du Sud]) et il en résulte souvent un contrôle insuffisant du ravageur, des échecs ayant été observés lors des introductions (Alam, 1992 [Jamaïque]).

Une possibilité de pallier ces échecs consiste à rechercher de nouvelles souches plus "performantes" pour les réintroduire dans les zones de faible efficacité, permettant alors le renforcement du biocontrôle dans ces régions et une limitation de l'emploi des insecticides. On peut supposer que ces souches plus efficaces sont à chercher dans les pays où l'on observe déjà un fort taux de parasitisme de *P. xylostella*, indiquant que ces populations sont plus aptes à parasiter *P. xylostella* ou que les conditions climatiques régnantes leur sont favorables. Il devient alors important de déterminer les facteurs mis en jeu, car on recherche des parasitoïdes restant performants sous le nouveau climat auquel ils seront soumis après l'introduction : ils doivent donc disposer de bonnes qualités "intrinsèques" peu dépendantes de la variabilité environnementale.

De multiples hypothèses sont envisageables pour déterminer les sources des variations de performances entre les différentes populations :

1- Facteurs environnementaux

a) Climatiques : *Plutella xylostella* est un insecte cosmopolite, grand migrateur et il vit donc sous une grande variété de climats, auxquels doivent aussi s'adapter ses parasitoïdes. Une multitude d'adaptations locales ont pu se développer afin de supporter au mieux les contraintes climatiques régionales. Ainsi les populations japonaises de *C. plutellae* sont diapausantes au nord du pays et simplement hivernantes au sud (Alvi & Momoi, 1994).

b) Biotiques : compétition avec d'autres espèces de parasitoïdes localement présentes (cf. chap. III) et action des hyperparasites (Alam, 1992).

c) Interférence avec des entomopathogènes, telles les microsporidies (Nahif & Jungen, 1998). Ces protozoaires ne détruisent pas complètement les populations de *P. xylostella* infectées mais les affaiblissent et elles peuvent continuer à se développer à un rythme réduit. Par contre les chenilles malades ne supportent pas d'être parasitées en plus par *C. plutellae* et elles meurent avant la fin du développement des larves du parasitoïde. En l'absence de descendance, les populations du parasitoïde disparaissent et il subsiste quelques chenilles qui continuent à provoquer des dégâts, même si ceux-ci sont moindres. D'autres entomopathogènes tels les champignons parfois utilisés pour lutter contre *P. xylostella*, peuvent aussi interférer avec les parasitoïdes (Furlong & Pell, 1996).

2- Facteurs "intrinsèques"

a) Réponse de défense différentielle de l'hôte face au parasitoïde : ainsi les populations de *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera : Drosophilidae) diffèrent par leur capacité à détruire les œufs et les larves de leurs parasitoïdes (Carton & Nappi, 1991 ; Kraaijeveld & Godfray, 1999). Chez cette drosophile vient justement d'être mis en évidence un gène de résistance contre son parasitoïde *Leptopilina boulardi* (Barbotin, Carton & Kelner-Pillault) (Hym. : Figitidae : Eucoilinae) (Hita *et al.*, 1999 ; Poirié *et al.*, 2000).

b) A l'opposé, incapacité du parasitoïde à contrer efficacement les défenses immunitaires de son hôte d'où risque d'encapsulation plus élevé pour lui. Chez *C. plutellae* ceci pourrait être lié à des performances insuffisantes de son polydnavirus symbiote, nécessaire à la réussite du parasitisme (Drezen, 1999).

c) Fitton & Walker (1992) ont envisagé une possibilité extrême, à savoir que l'on pourrait avoir en fait plusieurs espèces de *Cotesia* attaquant *P. xylostella* dans le monde et pas seulement *C. plutellae*.

Pour vérifier la pertinence de certaines de ces hypothèses et déterminer leur rôle réel dans la production de la variabilité affectant les performances de *C. plutellae*, nous avons mené une série d'expériences sur plusieurs populations de *C. plutellae*, d'origines géographiques différentes : Bénin, Brésil, Taïwan et Ile de la Réunion. Ces expériences, en s'attachant soit à l'analyse des facteurs environnementaux, soit à l'analyse de facteurs "intrinsèques", doivent permettre de quantifier la variabilité liée à chacun des différents facteurs étudiés.

Ces expériences se sont articulées en quatre groupes :

1) Croisements entre les populations de *C. plutellae* pour confirmer leur interfécondité et de là l'appartenance à une seule et même espèce. Ces croisements doivent se faire dans les deux sens, c'est-à-dire en croisant des individus des deux sexes pour chaque population afin d'observer s'il n'existe pas des stérilités liées à la présence de bactéries *Wolbachia* cytoplasmiques (Rigaud & Rousset, 1996 ; Quicke, 1997).

2) Etudes sur le terrain de populations très éloignées géographiquement, au Brésil et sur l'île de la Réunion. Ces populations vivant sous des conditions climatiques tropicales (où *P. xylostella* occasionne le plus de dégâts) mais bien distinctes (climat de savane d'un côté, climat océanique humide de l'autre), il est possible d'observer le comportement de *C. plutellae* et son efficacité face à ces conditions et à des compétiteurs différents. L'utilisation de groupes de parcelles dans les deux zones d'étude, couplée à la répétition des techniques de culture des choux et d'échantillonnage, permet de distinguer la variabilité locale des populations pour mieux cerner la variabilité globale.

3) Analyses biochimiques : recherche d'allozymes par électrophorèse isoenzymatique sur gels d'acétate de cellulose, technique bien adaptée à cette petite espèce. L'analyse de la fréquence des allèles détectés dans les systèmes enzymatiques polymorphes permet de calculer la différenciation génétique entre populations de *C. plutellae*. Il est alors possible de relier ces valeurs à d'éventuelles incompatibilités sexuelles entre les populations, et de vérifier si de telles incompatibilités pourraient être expliquées par une dérive génétique devenue trop élevée. Appliquées à un plus grand nombre de populations, ces mesures pourraient aussi permettre d'en construire une phylogénie et de déterminer la provenance de *C. plutellae* dans les pays situés en dehors de son aire de répartition originelle et où aucune introduction volontaire n'a été signalée.

4) Analyse génétique : nous nous sommes focalisés sur une caractéristique unique de certains groupes de Braconidés dont *C. plutellae* fait partie (et connue aussi de certains Ichneumonidés) : ces espèces possèdent un polydnavirus symbiote, donc extrêmement spécifique, jouant un rôle majeur dans le succès parasitaire des guêpes parasitoïdes qui en sont porteuses. Or une variabilité de l'ADN de ces polydnavirus est déjà connue au niveau des populations et même des individus de certaines espèces de Braconidés (Stoltz & Xu, 1990) et un tel virus, s'il est retrouvé chez *C. plutellae*, pourrait alors constituer un marqueur original et facile d'accès des différentes souches de l'espèce. La technique utilisée pour la détection du virus et l'analyse de sa variabilité potentielle est la RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) sur l'ADN total extrait des ovaires des guêpes.

La découverte de liaisons entre ces sources de variabilité offrirait des potentialités intéressantes dans la sélection de nouvelles souches en lutte biologique. Nous pourrions alors espérer comprendre pourquoi nous observons de telles différences dans le comportement et l'efficacité des populations de *C. plutellae*. Et par là même, nous verrions aussi apparaître la possibilité d'utiliser des techniques d'analyse moléculaire pour déterminer l'efficacité d'une souche en vue de son introduction sans nécessiter d'aussi importants tests de laboratoire que ceux habituellement menés pour s'assurer de la sûreté de l'opération, réduisant alors l'important taux d'échec qui est trop souvent le résultat final des introductions à des fins de lutte biologique (Malakoff, 1999).

The first of these is the fact that the...
...the second is the fact that the...
...the third is the fact that the...
...the fourth is the fact that the...
...the fifth is the fact that the...
...the sixth is the fact that the...
...the seventh is the fact that the...
...the eighth is the fact that the...
...the ninth is the fact that the...
...the tenth is the fact that the...

The first of these is the fact that the...
...the second is the fact that the...
...the third is the fact that the...
...the fourth is the fact that the...
...the fifth is the fact that the...
...the sixth is the fact that the...
...the seventh is the fact that the...
...the eighth is the fact that the...
...the ninth is the fact that the...
...the tenth is the fact that the...

The first of these is the fact that the...
...the second is the fact that the...
...the third is the fact that the...
...the fourth is the fact that the...
...the fifth is the fact that the...
...the sixth is the fact that the...
...the seventh is the fact that the...
...the eighth is the fact that the...
...the ninth is the fact that the...
...the tenth is the fact that the...

CHAPITRE II

Organismes étudiés

CHAPTER II

OLYMPIAN GROUP

II.1 - *Plutella xylostella* (L.) ou teigne des Brassicacées

II.1.1 - Systématique

La position systématique de *Plutella xylostella* est actuellement :

Lepidoptera

Tinoidea

Yponomeutidae

Plutellinae

Plutella xylostella (Linné, 1758)

Parfois classée dans la famille des Plutellidae et ayant subi plusieurs changements de nom, elle a longtemps été appelée *Plutella maculipennis* (Curtis) avant d'acquérir son nom actuel (Moriuti, 1986). C'est l'espèce la plus connue de ce genre, à cause de son importance économique. Le genre comprend plus d'une douzaine d'espèces se cantonnant surtout aux Brassicacées sauvages et économiquement bien moins importantes (Balachowsky, 1966 ; Smith & Sears, 1984).

II.1.2 - Situation géographique

Plutella xylostella est considérée comme originaire de la région méditerranéenne, où l'on trouve aussi le plus grand nombre d'espèces de parasitoïdes (Hardy, 1938 ; Balachowsky, 1966) et d'où sont originaires les principales Brassicacées cultivées (Bonnemaison, 1965 ; Zeven & de Wet, 1982).

Le chou cultivé *Brassica oleracea* est plus précisément originaire de la région est-méditerranéenne, autour de la Sicile (Raimondo, 1997). Il est très polymorphe, éclaté en de multiples populations souvent endémiques et soumises à une forte dérive génétique (Gustafsson, 1994). En fait *B. oleracea* regroupe une dizaine d'espèces distinctes mais qui forment pour la majorité des hybrides viables lors des expériences de croisements et elles sont ainsi groupées dans le cytodème *B. oleracea*, présentant un nombre chromosomique $2n = 18$ (Gustafsson & Lannér-Herrera, 1997). Ce complexe est à l'origine du chou "domestiqué" actuel et de ses nombreuses variétés commerciales. Les Lépidoptères qui consommaient à l'origine les choux sauvages ont pu s'adapter aux choux cultivés et les parasitoïdes de ces espèces ont dû s'adapter aussi à ces nouvelles conditions.

Cependant une origine en Asie Mineure a été suggérée (Chu, 1986) ou même en Afrique du Sud, dont une région possède un climat méditerranéen et où se trouvent aussi de nombreuses espèces de Brassicacées sauvages et un important cortège de parasitoïdes de *P. xylostella* (Kfir, 1997 ; Kfir, 1998).

Plutella xylostella est maintenant un insecte cosmopolite (**carte 1**), étant l'une des espèces naturellement les plus répandues au monde. C'est en effet un très grand migrateur, capable de franchir plus de 3 000 km d'une traite à l'aide des vents, traversant ainsi de grandes étendues marines (Chu, 1986). Ceci explique qu'on la retrouve régulièrement au Canada ou au nord du Japon (Hokkaido), où elle ne peut survivre en hiver mais où les vents du sud la ramènent tous les printemps (Harcourt, 1957 ; Smith & Sears, 1982 ; Honda, 1992 ; Honda *et al.*, 1992).

Elle s'adapte même au climat subantarctique (Crafford & Chown, 1987) et elle aurait ainsi réussi à atteindre naturellement l'île Marion (Chown & Avenant, 1992). Mais elle peut être aussi transportée accidentellement avec des jeunes plants (Shelton *et al.*, 1996) et seules des mesures de quarantaine sévères l'empêchent de coloniser les derniers archipels du Pacifique (Kiribati et Tuvalu pour les plus importants) d'où elle est encore absente (Waterhouse, 1992).

En fait, partout où poussent des Brassicacées dans le monde *P. xylostella* peut être présente. Malgré cette vaste aire de répartition les populations du papillon-hôte de *C. plutellae* restent interfécondes, montrant leur appartenance à la même espèce (Pichon, comm. pers.).

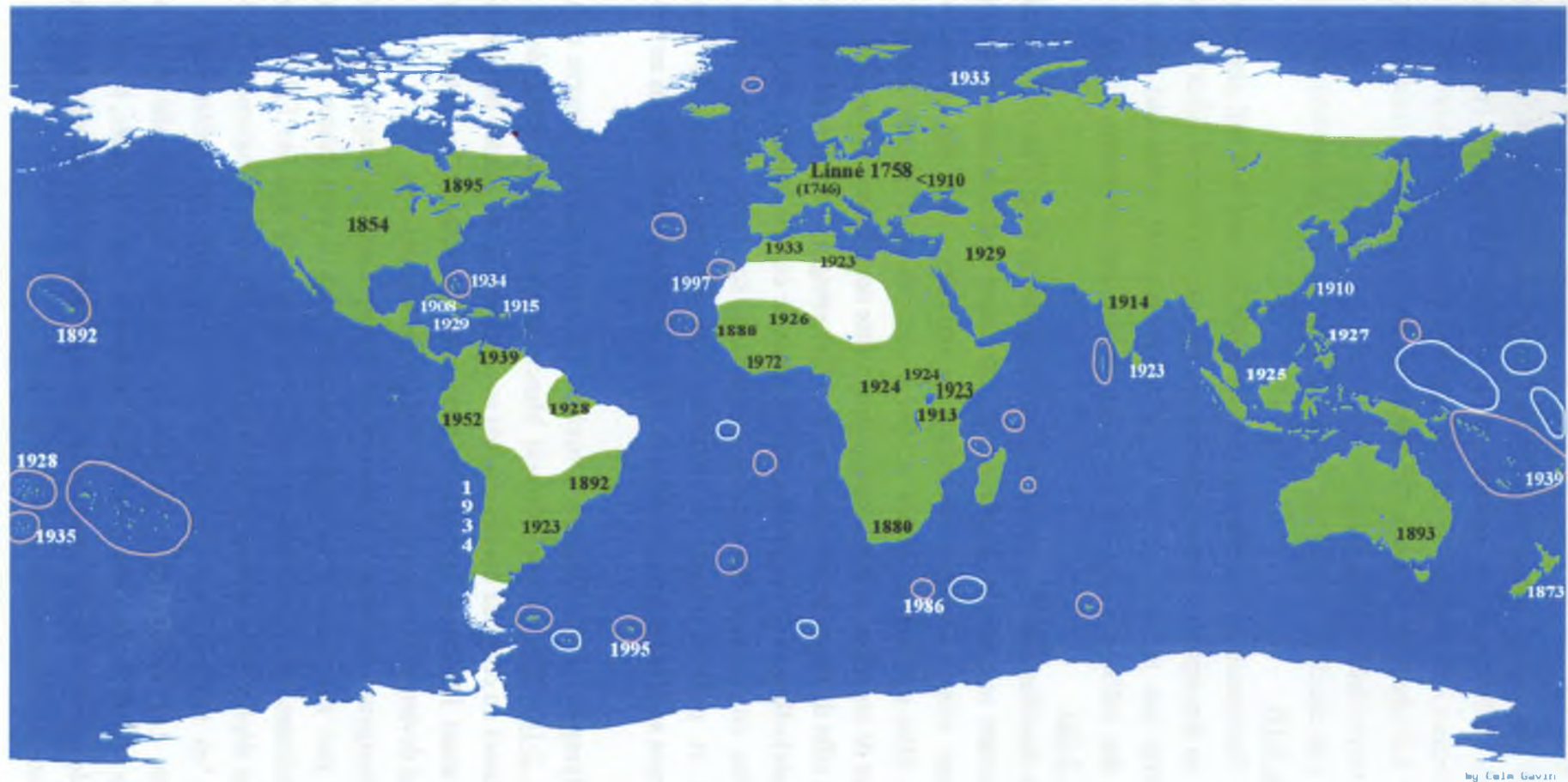
II.1.3 - Description

- **Adulte** : c'est un papillon de longueur inférieure à 10 mm, pour une envergure d'environ 15 mm. Au repos, il conserve les ailes plaquées contre le corps, "en toit". La frange claire le long du bord antérieur des ailes antérieures forme alors une série de 2-3 losanges alignés dorsalement, ressemblant à des losanges stylisés, d'où le nom anglo-saxon de "Diamondback moth", ou espagnol de "dorso de diamante" (**fig. 2-1a**) (Balachowsky, 1966). Ceci est plus visible chez le mâle, à couleurs plus contrastées. C'est le seul dimorphisme sexuel visible, le sexage sûr ne pouvant se faire que par observation des valves génitales sous stéréomicroscope. Les femelles attirent les mâles à l'aide d'une phéromone sexuelle (Chow, 1974 ; Maa, 1986), ces derniers possédant aussi une phéromone pour la reconnaissance spécifique à courte distance (Chow *et al.*, 1986). L'accouplement se fait "dos à dos" (**fig. 2-1b**). La femelle ne s'accouple qu'une seule fois et le mâle 1 à 3 fois (Talekar & Shelton, 1993), ce qui explique les études réalisées sur la faisabilité de la lutte autocide.

- **Les œufs** sont petits (environ 500 µm), blanc à jaune, pondus isolément ou en petits groupes (**fig. 2-1c**). Ils sont très peu visibles et difficiles à repérer sur les feuilles. La femelle pond généralement sur la face supérieure des feuilles (environ 60 %), le reste sur la face inférieure ou parfois sur les tiges (Talekar & Shelton, 1993).

Carte 1 : Aire de répartition de *Plutella xylostella* (L.).

Source principale : carte du CIE, 1967. Modifiée et complétée à partir des données des 1st, 2nd and 3rd international Workshops on Diamondback moth (1986, 1992 et 1997) et des dépouillements de la Review of Agricultural Entomology.



1893 : date de la première observation mentionnée dans la littérature pour le pays concerné

Présence de *P. xylostella* {
 Continents et grandes îles
 Petites îles et archipels

Absence {
 Continents et grandes îles
 Petites îles et archipels

- **Chenilles** : elles se développent en passant par 4 stades larvaires (Robertson, 1939).

* Les chenilles de **stade L1** sont endophylles, creusant des "virgules" dans le parenchyme (fig. 2-1d). Les stades suivants vivent à la surface de la feuille, de préférence sous la face inférieure moins exposée, qu'ils dévorent en laissant l'épiderme de la face opposée, formant des "fenêtres" caractéristiques de l'espèce (Chua & Lim, 1979).

* Les chenilles de **stade L2**, similaires aux L1 mais non mineuses, ont une tête noire et le corps clair, uni (fig. 2-1e).

* Les chenilles arrivées au **stade L3** sont souvent jaunes-brunes, à pilosité plus visible (fig. 2-1f).

* Finalement les chenilles du dernier **stade L4** sont vert vif, atteignant 8 mm ou plus, avec un dimorphisme sexuel apparent, ce qui est peu commun chez les chenilles : on peut observer une tache jaune sur le cinquième segment abdominal des chenilles qui donneront des mâles. Ce sont les testicules visibles par transparence (Liu & Tabashnik, 1997) (fig. 2-1g).

Les chenilles sont très vives, se laissant tomber au bout d'un fil à la moindre alerte. Elles remontent une fois le danger écarté. Elles sont solitaires mais non territoriales et peuvent donc vivre à quelques millimètres les unes des autres tant qu'elles ont assez de nourriture. Elles s'évitent cependant si elles se rencontrent et migrent facilement vers une autre source de nourriture si elles épuisent leur plante nourricière (Salinas, 1984).

Un effet de masse se produit si les chenilles atteignent une densité trop élevée sur les choux (Castelo-Branco & Gatehouse, 1999). Dans ce cas les femelles obtenues à partir de ces chenilles ont souvent des ovaires atrophiés et sont plus légères. Elles volent plus facilement et peuvent migrer en nombre vers d'autres sources de nourriture. Ce comportement semble favoriser les infestations du ravageur, tout au moins au Brésil.

- **Nymphe** : d'une longueur d'environ 5 à 7 mm, elle est entourée d'un cocon très lâche (fig. 2-1h). Elle est généralement blanche à rose clair au début de la nymphose, s'assombrissant au cours du développement avec apparition de bandes latérales sombres peu de temps avant l'éclosion. Ces bandes préfigurent les ailes et les autres appendices de l'imago, qui deviennent progressivement visibles par transparence.

L'émergence est rapide : le papillon sort brusquement de la nymphe, les ailes encore fripées. Il part s'accrocher à un support vertical d'où il peut laisser ses ailes s'étendre quelques minutes, plaquées l'une contre l'autre comme le font les Ephémères. Une fois entièrement déployées et sèches, il les place dans leur position habituelle, le long de son abdomen, "en toit". Il est alors prêt à l'envol, ce qu'il fait facilement à la moindre perturbation. Les malformations ne sont pas rares, lorsqu'une aile reste accrochée à l'enveloppe nymphale. Elle durcit dans cette position et reste déformée, le papillon devenant incapable de voler. En élevage ceci n'empêche cependant pas les femelles de se reproduire et de pondre sur les feuilles mises à leur disposition.

Figure 2-1 (a-h) : *Plutella xylostella* (L.)

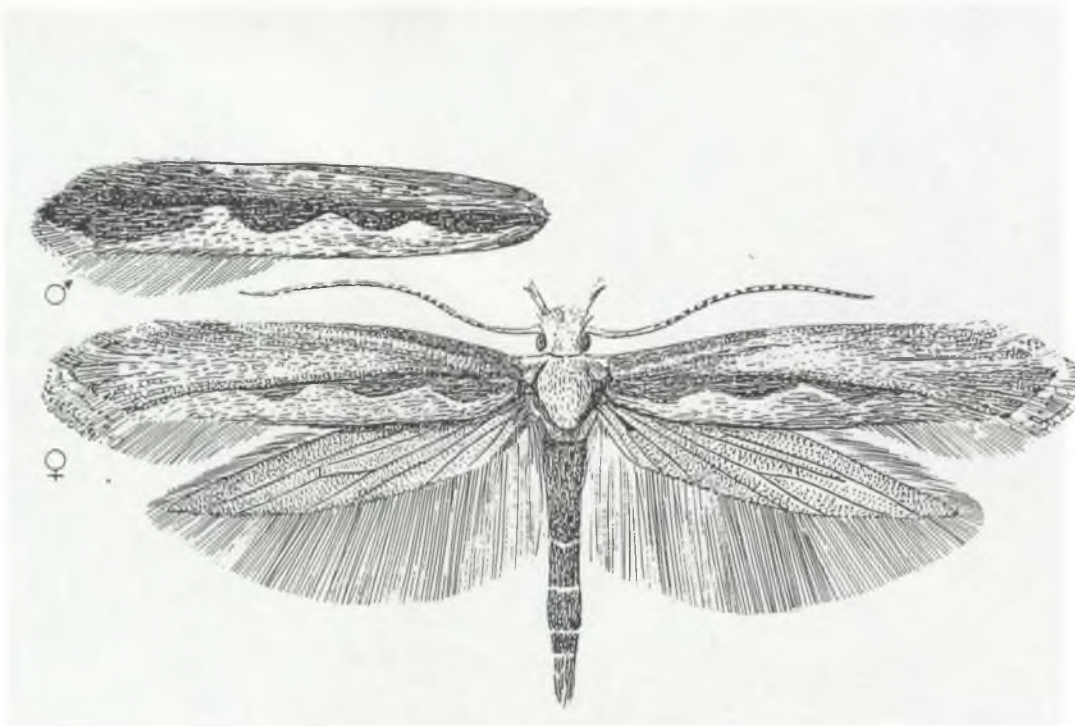


Figure 2-1a : *Plutella xylostella*, imago femelle et aile antérieure du mâle (grossissement : x 10) (d'après Balachowsky, 1966 ; tome II, fig. 100, p. 220).



Figure 2-1b : Accouplement de *P. xylostella* (grossissement x 8)
(mâle à droite, femelle à gauche)

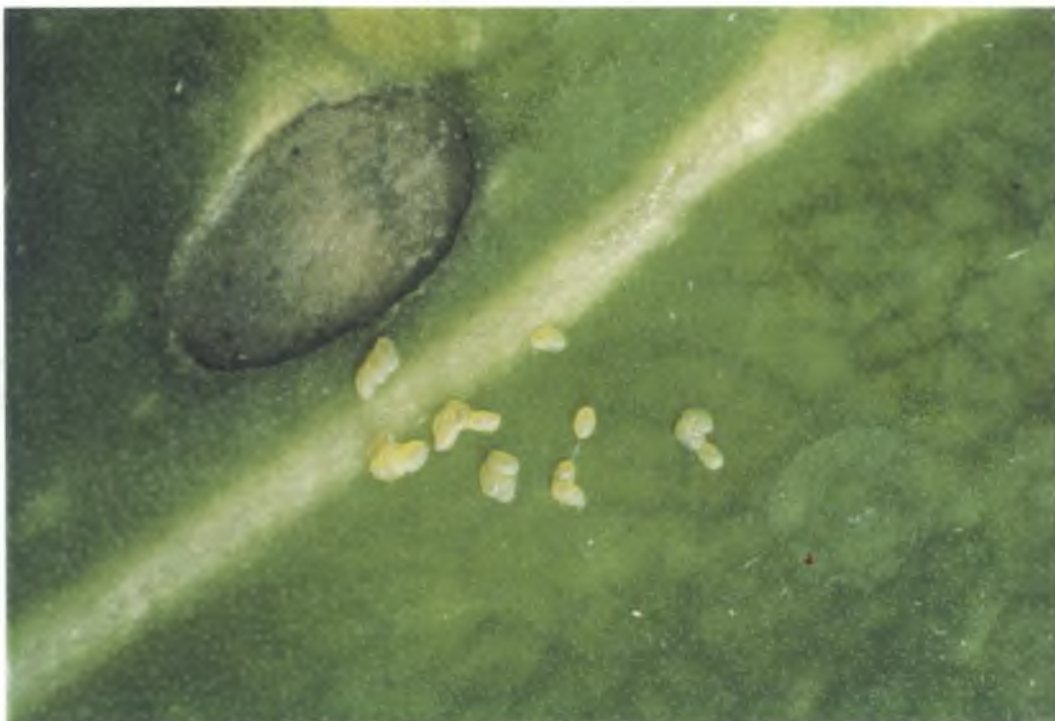


Figure 2-1c : œufs de *P. xylostella* sur feuille de chou (x 10)



Figure 2-1d : "Virgules" provoquées par les chenilles de stade L1 sur feuilles de chou (x 2)
Les zones claires de dimensions plus importantes sont des "fenêtres" créées par les chenilles plus âgées.



Figure 2-1e : Chenille de *Plutella xylostella* au stade L2, sur feuille de chou (x 25)

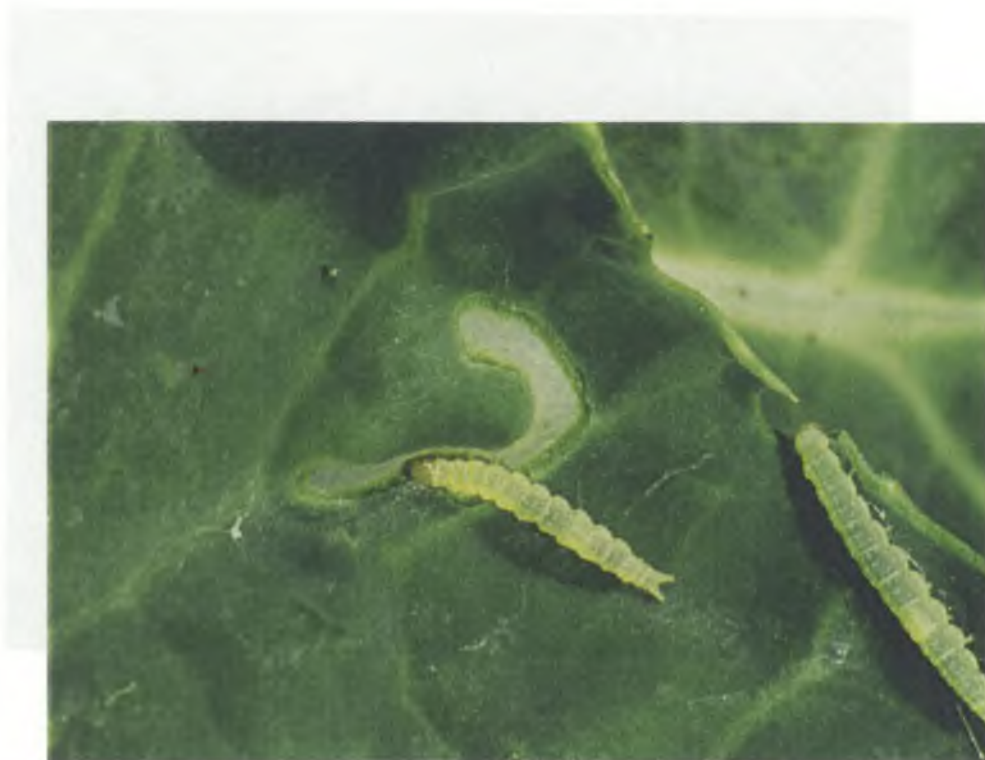


Figure 2-1f : Chenille de stade L3 (x 8)



Figure 2-1g : Deux chenilles au stade L4 (x 6)

Femelle à gauche, mâle à droite avec une tache jaune abdominale.



1 2 3 4

Figure 2-1h : Evolution nymphale chez *P. xylostella* (x 4).

- 1) Prénymphé dans son cocon
- 2 à 4) : Chrysalides extraites de leur cocon
- 2) Jeune chrysalide, de couleur verte
- 3) Chrysalide à un âge intermédiaire, de couleur rosée
- 4) Chrysalide proche de l'éclosion : le corps du papillon devient visible par transparence

II.1.4 - Biologie

II.1.4.1 - Nourriture

Plutella xylostella peut être considérée comme une espèce oligophage, car elle se nourrit presque exclusivement de plantes de la famille des Brassicacées (ex-Crucifères), même s'il s'agit d'une vaste famille. Elle est attirée par les composés soufrés (essentiellement des glucosinolates : sinigrine, sinalbine ainsi que l'isothiocyanate d'allyle) que contiennent ces plantes et qui sont des phagostimulants pour les chenilles et des stimulants de l'oviposition pour les femelles (Thornsteinson, 1953 ; Gupta & Thornsteinson, 1960a ; Gupta & Thornsteinson, 1960b ; Justus & Mitchell, 1996 ; Spencer, 1996).

Plutella xylostella vit essentiellement sur les choux et les autres Brassicacées cultivées (moutarde, colza, cresson, etc.), mais on la trouve aussi sur des Brassicacées sauvages comme la "Bourse-à-pasteur" *Capsella bursa-pastoris* (L.) ou la cardamine *Cardamina* spp. (Balachowsky, 1966 ; Verkerk & Wright, 1996). Elle aurait été observée exceptionnellement sur quelques autres espèces végétales à composés soufrés, comme les oignons ou la capucine (Kartzov, 1914). Elle préfère les Brassicacées cultivées, plus nourrissantes pour les ravageurs comme pour l'être humain et sur lesquelles elle se développe plus rapidement (Wakisaka *et al.*, 1992 ; Idris & Grafius, 1996 ; Begum *et al.*, 1996), mais les Brassicacées sauvages peuvent servir de réservoir durant les périodes où les cultures ne sont pas disponibles (Muhamad *et al.*, 1994).

II.1.4.2 - Développement

La vitesse de développement de *P. xylostella* dépend fortement de la température (Hardy, 1938). Ainsi, en élevage à 20 °C les individus ont besoin de plus de trois semaines en moyenne pour passer de l'œuf à l'imago (tableau 2-1).

Tableau 2-1 : Durée de développement de *Plutella xylostella* à 20 °C (Salinas, 1986b)

Stades de développement	Durée moyenne (jours)
Oeuf	6
Stades larvaires	15
Nymphe	9
Durée de vie de l'imago	18

A 25 °C le cycle est accéléré : l'éclosion des œufs prend 3 jours, le développement larvaire s'accomplit en 8-9 jours et la nymphose en 3-4 jours. L'insecte peut alors compléter son développement en à peine plus de deux semaines et donner plus d'une nouvelle

génération par mois. Cette rapidité de développement explique sa capacité à détruire rapidement les cultures attaquées sous les climats chauds, même si le nombre d'individus est faible au départ (cas de migrants amenés par le vent, par exemple).

En milieu tropical on peut observer plus de 20 générations (chevauchantes) par an (14-28 en Malaisie, 15-20 à Taïwan, 5-12 au Japon), contre seulement 4-5 au Canada (Harcourt, 1966 ; Miyata *et al.*, 1986).

La fécondité est élevée, la femelle pondant 150 à 200 œufs, mais présente aussi d'importantes variations (tableau 2-2). Elle dépend de multiples facteurs, tels la température, la qualité de la nourriture de la femelle pendant les stades larvaires ou la densité des populations. La fécondité totale des femelles ne semble pas significativement différente d'une population de *P. xylostella* à une autre (Pichon, 1999).

Toutefois chaque population possède son propre comportement de ponte : certaines populations pondent rapidement leurs œufs, dès les premiers jours après l'émergence de la femelle, d'autres l'étaient sur quatre semaines (Pichon, 1999). Ceci peut être lié aux conditions environnementales auxquelles sont soumises ces populations : ainsi au Bénin, où des cultures de choux sont présentes toute l'année à différents stades de leur développement, les femelles de *P. xylostella* peuvent pondre progressivement leurs œufs et étalent leur ponte sur près d'un mois, en sélectionnant alors les meilleurs plants. A l'opposé, pour une population australienne (en zone de climat méditerranéen) par exemple, où les parcelles de choux sont dispersées et pas présentes toute l'année, le papillon présente une stratégie de ponte rapide (durée totale de l'ordre de deux semaines) : s'il détecte une parcelle de choux il peut être plus avantageux pour lui de pondre tous ses œufs au même endroit plutôt que de se risquer dans la recherche aléatoire de meilleures plantes plus loin.

**Tableau 2-2 : Quelques valeurs de la fécondité dans diverses populations de
*Plutella xylostella***

Pays	Nombre d'œufs pondus par femelle		Références
	Moyenne	Extrêmes	
Taïwan	75	-	Lu & Lee, 1984
Pakistan	190	-	Abro <i>et al.</i> , 1992
Corée	-	50-240	Kim & Lee, 1991
- Corée : île de Cheju	155-175 (à 20 °C)	-	Park <i>et al.</i> , 1993
Canada	160 (moy. annuelle)	-	Harcourt, 1986
USA	140 (26 °C)	55-220	Salinas, 1986a
Vénézuela	160 (18 °C)	-	Salinas, 1986a
Grande-Bretagne	250 (20 °C)	100-600	Hardy, 1938
France	205 (laboratoire, 25 °C)	-	Pichon, 1999
Australie (Perth)	188 (laboratoire, 25 °C)	-	
Bénin	184 (laboratoire, 25 °C)	-	
Brésil	167 (laboratoire, 25 °C)	-	
Philippines	145 (laboratoire, 25 °C)	-	

II.1.5 - Lutte contre *Plutella xylostella*

Plutella xylostella est le principal destructeur des cultures de Brassicacées dans le monde, nécessitant d'importants moyens de lutte. Le seuil économique est atteint dès qu'il y a une chenille de stade L4 par chou, car les trous créés par celle-ci suffisent à altérer l'aspect de la plante et à la rendre invendable (Shelton *et al.*, 1983 ; Maltais *et al.*, 1998). De nombreuses méthodes de lutte ont été testées, quoique la plupart restent à l'état expérimental.

II.1.5.1 - Lutte chimique

L'utilisation d'insecticides reste la méthode de lutte la plus répandue, chez *P. xylostella* comme chez de nombreux autres ravageurs.

Dans la première moitié du siècle, l'éventail des produits reste limité : composés minéraux (arsénicaux et fluorures par exemple), fumigants avec ajouts d'huile et d'hydrocarbures, mais aussi quelques composés végétaux : extraits de tabac (produit actif : nicotine), de derris (roténone) ou de pyrèthres (pyréthrines) (Huckett, 1934 ; Walker, 1934). Trop toxiques ou peu efficaces, ils sont supplantés à partir de 1945 par les insecticides de synthèse, d'une efficacité très supérieure, le premier étant le DDT rapidement suivi du lindane et autres organochlorés, puis des organophosphorés et de nombreux autres produits par la suite (Slade, 1945 ; Greaves, 1945 ; Harcourt & Cass, 1955).

Cependant *P. xylostella* démontre ses redoutables capacités d'adaptation : dès 1951 apparaît le premier cas de résistance au DDT en Indonésie (Ankersmith, 1953) et en 1958 il existe des populations résistantes à tous les principaux organochlorés (Mo, 1959 ; Ooi, 1986). En 1980 on recense déjà dans 14 pays des cas de résistance envers 36 produits différents (Miyata *et al.*, 1986) et envers 51 produits en 1989. Les populations de *P. xylostella* ont continué de développer des résistances contre tous les nouveaux produits mis sur le marché, parfois en moins d'un an (Tanaka, 1992 ; Shelton *et al.*, 1993), y compris vis-à-vis des toxines de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (Tabashnik *et al.*, 1997) (tableau 2-3). Le méthomyl favorise même son développement en augmentant sa fécondité et en tuant ses prédateurs (Nemoto, 1986). A titre d'exemple, citons l'exemple de cultures actuelles de choux (août 2000) en Indonésie, où 17 traitements insecticides durant les quatre mois nécessaires pour amener le chou à maturité ne suffisent pas à détruire *P. xylostella* (Bordat, comm. pers.).

Le retour à des insecticides d'origine biologique, extraits de végétaux, est actuellement tenté : de nombreuses substances ont été testées (Morallo-Rejesus, 1986 ; Hermawan *et al.*, 1998) mais seuls les extraits de neem (dont le principe actif est l'azadirachtine) offrent la possibilité d'une utilisation à grande échelle, peu coûteuse et

Tableau 2-3 : Exemples de cas de résistance aux insecticides chez *Plutella xylostella*

Apparition de la résistance	Pays d'apparition	Produits concernés	Références
1951	Indonésie	DDT	Ankersmith, 1953
1956	Malaisie	DDT, lindane, dieldrine	Ooi, 1997
1959	Indonésie	Organochlorés	Mo, 1959
1964	Indonésie	Malathion	Cheng, 1986
1965	Thaïlande	Carbaryl	Rushtapakornchai & Vattanatanguen, 1986
1966	Inde	DDT ; parathion	Raju, 1996
1974	Philippines	EPN ; mevinphos	Talekar & Shelton, 1993
1978	Inde	Diazinon	Raju, 1996
1981	Japon	Methomyl	Cheng, 1986
1981	USA : Hawaii	Tous les produits autorisés	Tabashnik <i>et al.</i> , 1987
1981	Taïwan	Pyréthriinoïdes ; DDT ; cartap ; organophosphorés ; carbamates, parfois sur une même population	Liu <i>et al.</i> , 1981 Liu <i>et al.</i> , 1982
1982-1983	Thaïlande	Prothiophos, profenophos	Rushtapakornchai & Vattanatanguen, 1986
1986	Taïwan	Carbamates ; Organophosphorés	Chen & Sun, 1986
1986	Japon	Cartap	Hama <i>et al.</i> , 1992
1987	USA : Hawaii	Pyréthriinoïdes	Tabashnik <i>et al.</i> , 1987
1988	Malaisie	IGR ; abamectine	Fauziah <i>et al.</i> , 1992
1989	Inde	Pyréthriinoïdes	Raju, 1996
1989	Honduras	Cyperméthrine, méthomyl ; méthamidofos	Ovalle & Cave, 1989
1988	Thaïlande	IGR (benzoylphenylurées)	Talekar & Shelton, 1993
1986-1988	Japon	Endotoxines de "Bt"	Hama <i>et al.</i> , 1992
1989-1990	USA : Hawaii	Résistance croisée à plusieurs classes d'endotoxines "Bt"	Tabashnik <i>et al.</i> , 1997
1990	Malaisie	IGR (benzoylphenylurées)	Ooi, 1997
1990	USA:Pennsylvanie	Endotoxines "Bt"	Tabashnik <i>et al.</i> , 1997
1990	USA : Floride, New York	Endotoxines "Bt"	Shelton & Wyman, 1992
1993	Philippines	Endotoxines "Bt"	Tabashnik <i>et al.</i> , 1997
1999	(Laboratoire)	Plantes transgéniques "Bt"	Tang <i>et al.</i> , 1999

efficace, bien qu'ils présentent des effets phytotoxiques, modifiant notamment la couleur des feuilles de choux (Loke *et al.*, 1992 ; Schmutterer, 1992 ; Leskovar et Boales, 1996). Ils peuvent aussi interférer avec le développement des parasitoïdes, mais comparativement beaucoup moins qu'avec le ravageur (Goudegnon *et al.*, 2000 ; Perera *et al.*, 2000).

Malgré toute la palette de produits disponibles, il existe des cas où les agriculteurs sont amenés à abandonner leurs cultures de Brassicacées ou à trouver d'autres méthodes de lutte, comme c'est le cas dans des serres à Hawaï ou au Japon, car le papillon est devenu virtuellement résistant à tous les produits autorisés aux doses sanitaires utilisables (Nakahara *et al.*, 1986 ; Tanaka, 1992).

II.1.5.2 - Autres méthodes de lutte

Parmi les nombreuses techniques imaginées, seule la lutte biologique est utilisée à grande échelle (§ II-2). Avant de détailler les groupes d'organismes utilisables dans le cadre du biocontrôle, signalons les autres techniques "alternatives" étudiées pour essayer de réguler les populations de *P. xylostella* sans utiliser d'insecticides.

- **Sélection variétale** : il existe des variétés de choux moins sensibles aux attaques des chenilles, par l'intermédiaire de deux mécanismes distincts : soit à l'aide de mécanismes d'antibiose (Eigenbrode *et al.*, 1990 ; Eigenbrode & Shelton, 1992), soit grâce à des changements de la structure des cires épicuticulaires qui diminuent l'appétance du chou pour les chenilles (Eckenrode *et al.*, 1986 ; Stoner, 1992 ; Shimabuku *et al.*, 1997). Des variétés ainsi résistantes aux attaques des chenilles ont été créées mais sont peu employées car elles présentent des inconvénients en retour : les modifications induites peuvent favoriser d'autres ravageurs (tels les altises *Phyllotreta* spp. (Col. : Chrysomelidae) (Bodnaryk, 1997)) et elles donnent un aspect brillant aux feuilles ("glossy" leaves), peu apprécié des consommateurs. Des tests de sélection variétale pour lutter contre *P. xylostella* ont aussi été menés sur le colza, importante culture en Amérique de Nord (Ramachandran *et al.*, 1998) mais l'emploi de la transgénèse s'avère probablement plus intéressant pour créer des choux résistants.

- **Cultures intercalaires** ("intercropping") : son principe consiste à cultiver des rangs alternés de choux et d'une autre plante comme l'ail ou la tomate, dont l'odeur repousse le papillon, ou encore d'ajouter un semis de trèfle (Chelliah & Srinivasan, 1986 ; Talekar *et al.*, 1986 ; Finch & Kienegger, 1997). Cette technique s'avère peu intéressante car la seconde plante utilisée n'est pas d'un aussi bon rapport économique que le chou et ne convient pas à des agriculteurs qui sont généralement spécialisés sur cette seule culture. De plus il peut y avoir des problèmes de compétition entre les deux plantes, ce qui nuit au rendement (Schellhorn & Sork, 1997).

- **Plantes-pièges** : *Plutella xylostella* préférant la moutarde au chou, on intercale des rangées de moutarde dans les cultures de choux (de l'ordre d'une rangée de moutarde pour 7-10 de choux). Les papillons déposent préférentiellement leurs œufs sur la moutarde, épargnant ainsi les choux. Il suffit d'arracher les pieds de moutarde par la suite et de les détruire avec les chenilles qu'elles portent. Simple et efficace, la technique se développe en Inde (Talekar & Shelton, 1993) et l'Afrique du Sud commence aussi à s'y intéresser (Charleston & Kfir, 1999). Cependant certains agriculteurs sont réticents à utiliser cette technique qui implique de détruire volontairement une fraction de la récolte pour protéger le reste (Bordat, comm. pers.).

- **Rotation des cultures** : si *P. xylostella* est aussi abondante en milieu tropical, c'est qu'elle trouve des plantations à disposition toute l'année, lui permettant de se maintenir à des densités élevées. La priver temporairement de ses plantes-hôtes réduirait donc les populations. Mais on en revient à un problème financier pour les agriculteurs : il est difficile pour eux d'arrêter, ne serait-ce que quelques semaines, la production de la plante qui est leur seule ressource (Talekar & Shelton, 1993). De plus les grandes capacités migratrices de *P. xylostella* lui permettent de se réimplanter rapidement sur de nouvelles cultures, alors que ce n'est pas toujours le cas de ses parasitoïdes, ce qui peut en fait aggraver la situation.

- **Confusion ou piégeage sexuel** : cette technique a surtout une valeur prédictive, pour détecter les premières émergences de papillons adultes dans une région. Elle peut effectivement réduire significativement les quantités de papillons volant dans les champs, moyennant des contraintes telles que le remplacement régulier des pièges qui se salissent vite (Reddy & Urs, 1997). Un facteur limitant son efficacité est l'existence de variations géographiques et temporelles dans la composition des phéromones, ce qui peut limiter l'efficacité des formulations (Maa, 1986 ; Zilahi-Balogh *et al.*, 1995). Les pièges deviennent totalement inefficaces lors des invasions massives de *P. xylostella* où l'atmosphère est saturée de phéromones par les papillons (Ohbayashi *et al.*, 1992).

- **Lâchers de mâles stériles pour la lutte autocide** : cette méthode est étudiée uniquement à titre expérimental chez *P. xylostella* (Sastrodihardjo, 1986 ; Omar & Mamat, 1995).

- **Moyens mécaniques** :

(1) Utilisation de filets de protection. Les filets sont très efficaces et favorisent de plus le développement des choux en retenant la chaleur, mais ils restent très coûteux. Ils ne doivent absolument pas toucher les plantes sinon les papillons pondent à travers, en contact direct avec la feuille (Magallona, 1986).

(2) Dans les serres à cresson d'eau de Hawaï et du Japon, où *P. xylostella* résiste à tous les traitements classiques à des doses acceptables, on détruit le papillon soit par aspiration avec des ventilateurs mobiles soit par arrosage avec des sprinklers pour noyer les adultes et décrocher les chenilles des feuilles. Cette dernière technique est très efficace mais grosse consommatrice d'eau, ce qui favorise les moisissures et dilue les solutions nutritives utilisées en cultures hydroponiques (Tanaka, 1992). Ces techniques restent réservées aux cultures en serre, même si des essais d'aspersion d'eau à l'air libre ont été tentés (McHugh & Foster, 1995).

- Plantes transgéniques

La transgénèse "insecticide", avec intégration de gènes codant pour la production de diverses toxines d'origine bactérienne, végétale ou d'arthropodes venimeux, se développe de plus en plus (Schuler *et al.*, 1998). Elle concerne actuellement surtout le maïs ou le coton, dont de grandes étendues sont plantées sur le continent américain, mais des essais de création de colza ou de choux transgéniques résistant aux insectes phytophages ont été réalisés. Les tests de toxicité montrent généralement une grande efficacité de ces plantes dans la suppression de leurs ravageurs (Stewart *et al.*, 1996 ; Ramachandran *et al.*, 1998). Cependant il existe déjà des cas où des populations de *P. xylostella* résistantes au *Bacillus thuringiensis* consomment du chou transgénique sans le moindre problème (Tang *et al.*, 1999). Et il est probable qu'elle répètera cette "performance" dans les champs, étant donné ses puissantes capacités adaptatives. Elle résiste déjà à des mélanges de toxines de *B. thuringiensis* alors que les plantes transgéniques n'intègrent généralement qu'un gène codant pour une seule protéine insecticide (Tabashnik *et al.*, 1991 ; Ramachandran *et al.*, 1998).

II.2 - La lutte biologique

La lutte biologique reste la technique la plus employée, en remplacement de la lutte chimique si *Plutella xylostella* est vraiment trop résistante, ou en association (lutte intégrée) quand c'est possible, pour ralentir l'apparition de telles résistances et limiter la quantité de pesticides libérés dans l'environnement. Plusieurs groupes d'organismes ont été étudiés mais peu de ces groupes sont couramment utilisés contre *P. xylostella*.

- **Virus** : des épidémies apparaissent naturellement mais restent limitées (Asayama, 1986), même s'il s'avère que des traitements à base de virus à granulose donnent de bons résultats (Kadir, 1992). Des virus sélectionnés pour leur virulence seraient plus prometteurs (Kolodny-Hirsch & Beek, 1997 ; Grewal *et al.*, 1998) mais il n'y a pas d'utilisations à grande échelle contre cette espèce, à la différence du carpocapse de la pomme *Cydia pomonella* (L.) (Lep. : Tortricidae) par exemple.

- **Bactéries** : *Bacillus thuringiensis*, le Bt, est la seule bactérie utilisée, essentiellement sous forme de spores inactivées contenant des δ -endotoxines protéiques "Cry". Plusieurs centaines de ces toxines sont connues, mais seules certaines classes sont actives contre les Lépidoptères (d'autres n'agissent que sur les Coléoptères ou les Diptères) (Chaufaux, 1995 ; Monnerat, 1995). Plusieurs produits existent ainsi sur le marché, sous forme de mélanges des diverses classes de toxines, de composition variable selon la souche bactérienne utilisée (Federici & Maddox, 1996). Quoique considéré au début de son utilisation comme une "arme absolue" à laquelle les insectes ne pourraient jamais s'adapter, des cas de résistance sont d'abord apparus en laboratoire (McGaughey, 1985 ; McGaughey & Beeman, 1988), puis dans les champs : *Plutella xylostella* est le premier insecte à avoir développé une résistance aux toxines de *B. thuringiensis* en milieu naturel, avec des résistances croisées aux diverses classes de toxines (Tabashnik *et al.*, 1990 ; Wright *et al.*, 1995 ; Wright *et al.*, 1997 ; Tabashnik *et al.*, 1997). Par la suite, quelques autres insectes ont aussi développé des résistances (Sanchis *et al.*, 1995). Comme on se sert souvent de telles toxines pour créer les plantes transgéniques résistantes à leurs ravageurs, cela augure mal de leur efficacité à long terme, du moins face à *P. xylostella* (van Emden, 1999).

- **Champignons** (Entomophthorales) : comme pour les virus, des épidémies se produisent naturellement (Wilding, 1986 ; Pell *et al.*, 1993). Ces champignons sont cependant difficilement utilisables car ils ne prolifèrent qu'en milieu très humide, et seulement sous de fortes densités de populations de chenilles, donc lorsque les dégâts sont déjà importants (Riethmacher *et al.*, 1992). Ils peuvent de plus réduire l'efficacité de certaines espèces de parasitoïdes en les contaminant (Furlong & Pell, 1996).

- **Nématodes** : leur utilisation reste au stade expérimental (du moins dans la lutte contre *P. xylostella*) car ils sont coûteux à produire et sensibles à la lumière et à la sécheresse (Lello *et al.*, 1996 ; Baur *et al.*, 1997). Une utilisation restreinte aux cultures sous serre est cependant envisagée (Baur *et al.*, 1998) ou en zones tropicales humides (Mason & Wright, 1997).

- **Microsporidies** : aussi envisagées à titre expérimental (Haque *et al.*, 1999), elles sont à proscrire absolument car elles interfèrent avec les parasitoïdes et réduisent considérablement leur efficacité (cf. § II.4) (Bordat *et al.*, 1994 ; Gruarin, 1998).

Ce sont les **parasitoïdes** qui restent le groupe d'organismes le plus efficace dans la lutte contre *P. xylostella*, et souvent le moins coûteux : un lâcher de parasitoïdes est une opération relativement simple à effectuer en elle-même (Waage & Greathead, 1986), quoique non dénuée de risques écologiques et requérant de plus en plus souvent des tests de sécurité préalables (Malakoff, 1999).

Plutella xylostella est attaquée par de nombreux parasitoïdes, une centaine d'espèces au moins étant recensées (Lim, 1986 ; Talekar & Shelton, 1993 ; Monnerat, 1995). On en observe partout dans le monde, avec une diversité plus élevée dans la région méditerranéenne (Mustata, 1992), ce qui est un autre indice de l'origine de *P. xylostella* dans cette région.

Les espèces autochtones s'avérant parfois inefficaces pour réguler les populations de leur hôte, on cherche souvent à introduire de nouvelles espèces plus prometteuses, généralement le même groupe d'Hyménoptères (tableau 2-4). Ces espèces ou groupes d'espèces ont été libérés dans le monde entier, avec des résultats variables, mais de nombreuses implantations ont réussi et la répartition actuelle de ces espèces n'a plus grand-chose à voir avec leur aire d'origine (tableau 2-5).

Les Trichogrammes, minuscules parasitoïdes d'œufs, ont fait l'objet d'études mais ne sont pas utilisés en lutte biologique contre *P. xylostella* (Pak, 1992 ; Klemm *et al.*, 1992). Cependant des lâchers de Trichogrammes, surtout *Trichogramma evanescens* Westwood (Hym. : Trichogrammatidae) ont été réalisés pour protéger les champs de choux d'autres ravageurs tels les piérides, en Chine principalement (Wajnberg & Hassan, 1994).

Certains échecs observés lors d'introductions sont liés à la continuation des traitements insecticides malgré la résistance de *P. xylostella*. Ceci conduit à la destruction des parasitoïdes plus sensibles que leur hôte et on perd tout le bénéfice à retirer de l'introduction : ce fut le cas en Malaisie, aux Philippines et à Taïwan (Lim, 1986 ; Idris &

Grafius, 1993a, 1993b ; Ooi, 1997). La situation s'est nettement améliorée dans ces pays lorsque l'on est passé à des insecticides plus sélectifs des Lépidoptères, c'est-à-dire le Bt (du moins les souches à toxines ciblées contre ce groupe d'insectes) ou les régulateurs de croissance (Kao & Tzeng, 1992 ; Talekar & Shelton, 1993). Il existe aussi quelques rares cas où le parasitoïde devient lui-même résistant ou tout au moins tolérant aux insecticides (Chua & Ooi, 1986 ; Goudegnon *et al.*, 2000), ou plus curieusement ce sont les propres mécanismes de détoxification de la chenille qui protègent la larve de parasitoïde la consommant de l'intérieur (Furlong & Wright, 1993 ; Iqbal & Wright, 1996).

Cependant ces phénomènes de protection restent limités chez les parasitoïdes et sans commune mesure avec les niveaux de résistance observés chez *P. xylostella*. L'usage massif d'insecticides reste donc incompatible avec la lutte biologique.

Tableau 2-4 : Principales espèces d'Hyménoptères parasitoïdes observées chez *Plutella xylostella*

Genre	Espèce (s)	Descripteur	Famille	Stades parasités
<i>Trichogramma</i>	spp.		Trichogrammatidae	Oeufs
<i>Cotesia</i>	<i>plutellae</i>	(Kurdjumov)	Braconidae	Chenilles
<i>Apanteles</i>	spp.		Braconidae	Chenilles
<i>Microplitis</i>	<i>plutellae</i>	Muesebeck	Braconidae	Chenilles
<i>Diadegma</i>	spp.		Ichneumonidae	Chenilles
<i>Oomyzus</i>	<i>sokolowskii</i>	(Kurdjumov)	Eulophidae	Chenilles, émergence à partir des nymphes
<i>Diadromus</i>	<i>collaris</i>	(Gravenhorst)	Ichneumonidae	Nymphes

Tableau 2-5 : Cas recensés d'introductions pour les parasitoïdes de *Plutella xylostella*
(*Diadegma* spp., *Diadromus collaris*, *Cotesia plutellae* et *Oomyzus sokolowskii*)

(Références principales : Waterhouse & Norris, 1987 ; Waterhouse, 1992 ; Monnerat, 1995)

Pays d'introduction	Date d'introduction	Pays d'origine	Résultat
Afrique			
- Seychelles			
<i>Cotesia plutellae</i>	1972	Trinidad	?
<i>Diadromus collaris</i>	1972	Inde	?
- Iles du Cap-Vert			
<i>Cotesia plutellae</i>	1980-1981	Pakistan, via Trinidad	+
<i>Oomyzus sokolowskii</i>	1981-1982	Pakistan	+
Amériques			
- Brésil			
<i>Cotesia plutellae</i>	1972	Trinidad	? (1)
- Vénézuéla			
<i>Cotesia plutellae</i>	1993	Trinidad	- (2)
- Honduras, Belize, Costa-Rica			
<i>Cotesia plutellae</i>	1989-1990	?	- (3)
Caraïbes			
- Antigua			
<i>Cotesia plutellae</i>	1970-1972	Inde	+
	1972	Pays-Bas	?
<i>Diadegma semiclausum</i>	1949	Canada	?
<i>Diadromus collaris</i>	1972	Inde	?
- Barbade			
<i>Cotesia plutellae</i>	1968, 1970, 1974-1975	Inde	+
<i>Diadromus collaris</i>	1968, 1972, 1975	Inde	+
<i>Oomyzus sokolowskii</i>	1968, 1974-1976	Inde	+
- République Dominicaine			
<i>Cotesia plutellae</i>	1971-1972	Inde et Pays-Bas	+
<i>Diadromus collaris</i>	1972	Inde	?
- Jamaïque			
<i>Cotesia plutellae</i>	1972	Inde et Pays-Bas	?
<i>Diadegma semiclausum</i>	1949	Canada	?
<i>Diadromus collaris</i>	1972	Inde	?

- Montserrat				
<i>Cotesia plutellae</i>	1971	Inde	+	
- Saint-Kitts et Nevis				
<i>Cotesia plutellae</i>	1970-1972	Inde et Pays-Bas	+	
<i>Diadromus collaris</i>	1972-1973	Inde	-	
- Saint-Vincent et Grenadines				
<i>Cotesia plutellae</i>	1970-1972	Inde et Pays-Bas	+	
<i>Diadromus collaris</i>	1972-1973	Inde	-	
- Trinidad				
<i>Cotesia plutellae</i>	1976	Barbade	+	
<i>Oomyzus sokolowskii</i>	1976	Inde	+	
- USA (Missouri)				
	1978	Trinidad	?	(4)
- USA (Hawaii)				
<i>Cotesia plutellae</i>	1972	Taïwan	-	
	1971-1973	Trinidad	?	
	1980	Taïwan, Caraïbes	+	
	1983	Taïwan	+	
<i>Diadegma insulare</i>	1953	Kenya	+	
<i>Diadegma semiclausum</i>	1985	Pakistan	-	
<i>Diadromus collaris</i>	1972	Trinidad	-	
	1983	Pakistan	-	
<i>Oomyzus sokolowskii</i>	1953	Kenya	-	
Asie				
- Hong-Kong				
<i>Cotesia plutellae</i>	1968	Inde	-	(5)
<i>Diadegma</i> sp.	1968	Inde	?	
<i>Diadromus collaris</i>	1968	Inde	-	
<i>Oomyzus sokolowskii</i>	1968	Inde	?	
- Indonésie				
<i>Diadegma fenestralis?</i>	1928	Hollande	-	
<i>Diadegma semiclausum</i>	1950	Nouvelle-Zélande	+	
- Malaisie				
<i>Diadegma semiclausum</i>	1977-1978	Indonésie, Nouvelle-Zélande	+	
<i>Diadromus collaris</i>	1975-1978	Australie, Indonésie, Nouvelle-Zélande	+	
<i>Oomyzus sokolowskii</i>	1975-1976	Inde	+	

- Sri Lanka			
<i>Diadromus collaris</i>	1965	Inde	?
- Thaïlande			
<i>Cotesia plutellae</i>	1965	Inde	-
	1970-1977	Inde	-
	1971-1972	Pays-Bas	-
	1976	Barbade	+
<i>Diadegma insulare</i>	1964	Canada	?
<i>Diadromus collaris</i>	1965	Inde	?
<i>Oomyzus sokolowskii</i>	1965	Inde	-
	1968	Inde	-
	1976	Inde	-
	1981-1982	Pakistan	+
Océanie			
- Australie			
<i>Cotesia plutellae</i>	1951-1953	Italie	+
<i>Diadegma fenestralis?</i>	1936	Royaume-Uni	-
	1938	Nouvelle-Zélande	-
<i>Diadegma semiclausum</i>	1947-1951	Nouvelle-Zélande	+
<i>Diadegma tibialis</i>	1951-1952	Italie	-
<i>Diadromus collaris</i>	1947-1951	Nouvelle-Zélande	+
	1951-1952	Italie	+
Tasmanie			
<i>Diadegma semiclausum</i>	1947	Nouvelle-Zélande	+
<i>Diadromus collaris</i>	1947	Nouvelle-Zélande	+
- Iles Cook			
<i>Diadegma semiclausum</i>	1974-1975	Nouvelle-Zélande	-
	1990	Nouvelle-Zélande	?
<i>Diadromus collaris</i>	1974-1975	Nouvelle-Zélande	+
- Iles Fidji			
<i>Cotesia plutellae</i>	1971	Inde	-
	1972	Trinidad	-
	1984	Trinidad	+
<i>Diadegma semiclausum</i>	1945	Nouvelle-Zélande	?
	1990	Taiïwan	?
<i>Diadromus collaris</i>	1943	Nouvelle-Zélande	-
	1971	Inde	-
<i>Oomyzus sokolowskii</i>	1984	Trinidad	+

- Nouvelle-Zélande			(6)
<i>Diadegma semiclausum</i>	1936	Royaume-Uni	+
<i>Diadromus collaris</i>	1937	Royaume-Uni	+
- Papouasie-Nouvelle-Guinée			
<i>Cotesia plutellae</i>	1983	Hawaïi et Malaisie	+
- Tonga			
<i>Diadromus collaris</i>	1943	Nouvelle-Zélande via les îles Fidji	-
- Guam			
<i>Cotesia plutellae</i>	1971-1972	Inde	-
<i>Diadegma insulare</i>	1975	Hawaïi	-
<i>Diadromus collaris</i>	1975	Inde	-
<i>Oomyzus sokolowskii</i>	1975	Inde	-

(1) : *Cotesia plutellae* est observé à Brasilia depuis au moins 1979 (Barbosa & França, 1981)

(2) : Chaves *et al.*, 1993

(3) : Cordero & Cave, 1992 ; Andrews *et al.*, 1992

Selon Andrews *et al.* (1992) *C. plutellae* serait implanté au Honduras.

(4) : Cock, 1985

(5) : *Cotesia plutellae* est actuellement présent à Hong-Kong (Kirk, obs. pers., 1997)

(6) : Un projet d'introduction de *C. plutellae* est prévu (Waage & Cherry, 1992)

II.3 - *Cotesia plutellae*

II.3.1 - Systématique

La présence régulière de *C. plutellae* dans les essais d'introduction et sa vaste répartition permettent de suggérer que cette espèce offre un potentiel intéressant. C'est une espèce présentant de plus peu de problèmes pour son identification. C'est un avantage non négligeable lors d'essais d'introduction, comparativement au groupe complexe des *Diadegma* spp. où la détermination spécifique est quasi-impossible (Fitton & Walker, 1992).

Cotesia plutellae n'a subi que quelques modifications taxonomiques : décrit au début du siècle par Kurdjumov (1912), redécrit en détail par Wilkinson (1939), il a d'abord été nommé *Apanteles plutellae*.

Le grand genre *Apanteles*, trop disparate, a éclaté et a vu une partie de ses espèces reclassées vers de nouveaux genres au sein de la sous-famille des Microgastrinae, entièrement révisée par Mason (1981). *Apanteles plutellae* est ainsi devenu *Cotesia plutellae* et l'est resté depuis.

Caractéristiques de ces taxons :

Sous-famille **Microgastrinae** - Principaux caractères de diagnose :

- Flagelle antennaire toujours à 16 articles
- Stigmates trachéens du premier segment abdominal situés sur un latérotergite et non sur le tergite lui-même.

Les genres *Apanteles* (*sensu stricto*) et *Cotesia* restent dans cette sous-famille.

Apanteles appartient à la tribu des Apantelini.

● Principaux caractères de diagnose :

- Fourreau de l'ovipositeur "long", c'est-à-dire de longueur supérieure à la moitié de la longueur du tibia des pattes postérieures. Fourreau poilu sur toute sa longueur.
- Ovipositeur long émergeant distalement des valvifères (cf. fig. 3-5).
- Larves à mandibules fortement dentées.
- Endoparasitoïdes presque toujours solitaires ; hôtes appartenant majoritairement aux "Microlépidoptères".

Le genre *Apanteles* lui-même se distingue par la striation de l'hypopygium, qui possède aussi un fort pli médial. Le genre rassemblerait encore 2 000 espèces (après cette révision).

Cotesia se retrouve quant à lui dans la tribu des Cotesiini.

● Principaux caractères de diagnose :

- Fourreau de l'ovipositeur "court", c'est-à-dire de longueur inférieure à la moitié de la longueur du tibia des pattes postérieures. Fourreau pratiquement glabre.
- Ovipositeur très court, trapu, émergeant proximalelement sur les valvifères (fig. 2-2a).
- Mandibules des larves avec peu ou généralement pas de dents (fig. 2-2c).
- Espèces souvent grégaires. Endoparasites, très majoritairement sur "Macrolépidoptères".

Le genre *Cotesia* lui-même se distingue par son propodeum très rugueux et caréné. Il est devenu après cette révision le genre de Braconidés le plus commun et le plus ubiquiste de la planète, quoique plus courant en zones tempérées. Il est presque aussi riche en espèces que le genre *Apanteles* dont il dérive, avec au moins 1 500 espèces connues (en 1981).

La position taxonomique actuelle de *C. plutellae* est :

Hymenoptera

Apocrita Terebrantia

Ichneumonoidea

Braconidae

Microgastrinae

Cotesia plutellae (Kurdjumov, 1912)

II.3.2 - Situation géographique

Cotesia plutellae, probablement originaire de la région méditerranéenne comme son hôte, est devenu presque aussi répandu que lui (carte 2). Les observations reportées dans la littérature sont géographiquement dispersées mais couvrent tous les continents, ce qui laisse supposer que l'absence de recherches le rend plus rare qu'il ne l'est réellement. C'est probablement le parasitoïde de *P. xylostella* le plus répandu au monde, peut-être même cosmopolite comme son hôte quoique son aire de répartition actuelle soit essentiellement due à de multiples introductions (carte 3). C'est en effet un faible voilier, que l'on observe rarement à plus de quelques kilomètres de ses lieux de lâcher, même plusieurs années après l'introduction (Goudegnon, obs. pers. ; Mitchell *et al.*, 1999).

II.3.3 - Description

- **Adulte** : il a une longueur d'environ 3 mm et présente un dimorphisme sexuel (fig. 2-2a) :

- le mâle, avec une morphologie plus élancée, possède des antennes plus longues que le corps et un abdomen arrondi à son extrémité. Comme chez tous les Hyménoptères à reproduction sexuée, le mâle de *C. plutellae* est haploïde (Chapman, 1982). C'est un trait caractéristique de la reproduction haplodiploïde, où la détermination sexuelle est fonction de la fécondation ou de l'absence de fécondation des œufs (cf. chap. IV).

- la femelle, diploïde, est un peu plus massive, avec des antennes moins longues ou pas plus longues que le corps. Son abdomen est terminé par un court ovipositeur.

La longueur des antennes est le critère utilisé pour un sexage rapide à l'œil nu, mais une identification sûre ne peut se faire que par l'observation de l'abdomen, afin de vérifier la présence ou l'absence de la tarière. Ceci est réalisable avec une loupe de faible grossissement. C'est par exemple indispensable pour sexer les *C. plutellae* du Bénin dont les mâles et les femelles se ressemblent étonnamment, ainsi que pour les populations d'Afrique du Sud où les antennes des femelles sont plus longues que le corps.

Notons de nouveau que cette difficulté à observer le court ovipositeur ventral de *Cotesia* est la principale caractéristique qui distingue sur le terrain ce genre des *Apanteles*, dont les femelles sont très faciles à identifier par leur long ovipositeur apical (cf. fig. 3-5).

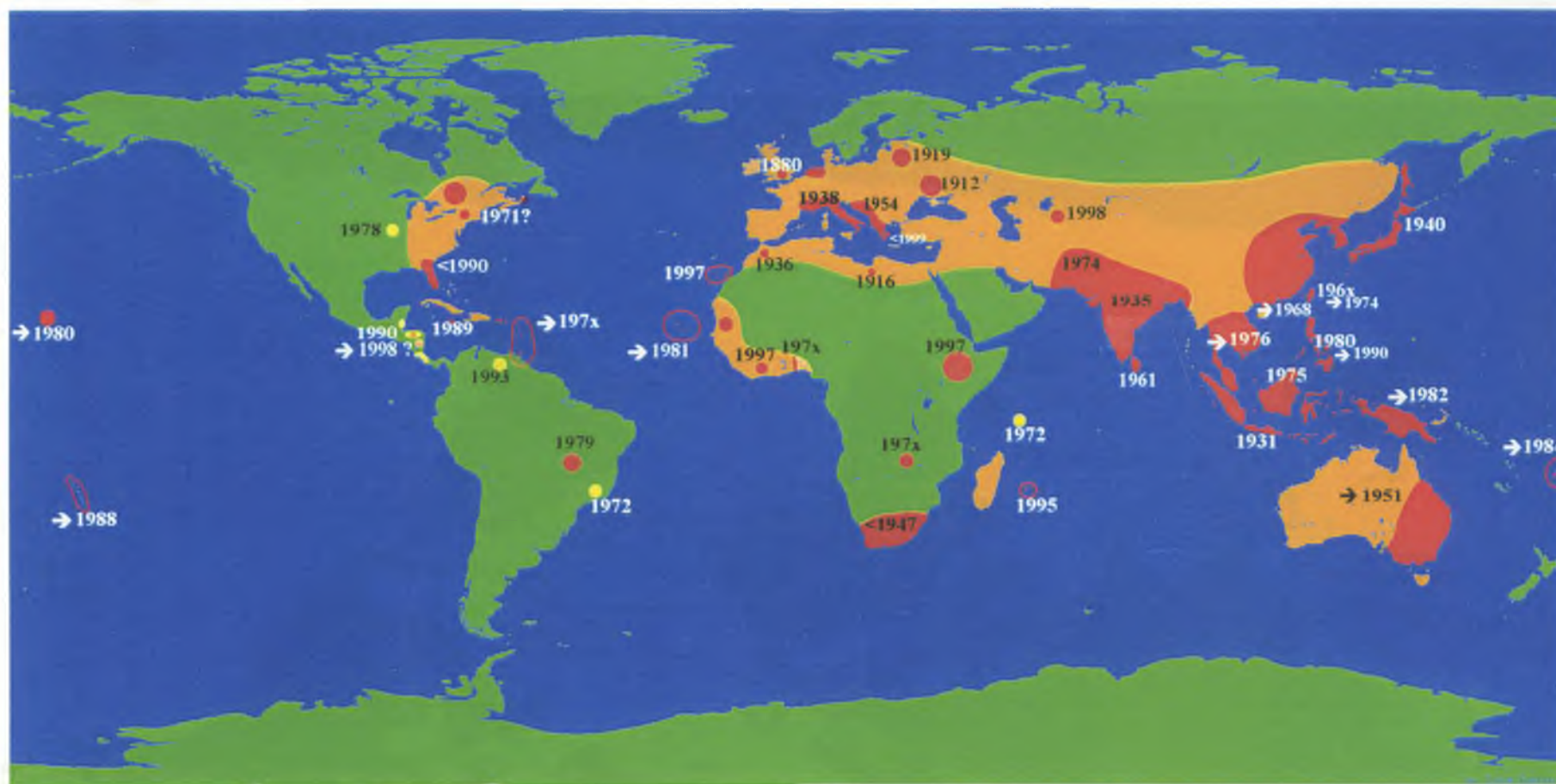
- **Stades pré-imaginaux** : la description est celle de Delucchi *et al.* (1954)

* **Œuf** (fig. 2-2b) : blanchâtre, pédonculé, il a une longueur de 40 µm pour un diamètre de 7 µm à l'oviposition, puis grossit pour atteindre des dimensions de 70 x 18 µm avant l'éclosion.

* **Premier stade larvaire** (fig. 2-2c) : il est caractérisé par une larve à grosse tête, munie d'un prolongement caudiforme avec une vésicule caudale. La larve est aussi ornée de spinules tergaux et dispose de mandibules simples et pointues, qui peuvent lui servir à lutter contre les autres larves en cas de superparasitisme de la chenille-hôte (Lloyd, 1940).

* **Second stade larvaire** (fig. 2-2d) : la larve possède alors une petite tête faiblement chitinisée avec des mandibules légèrement dentées. Les tergites sont ponctués, sans spinules. Le plus caractéristique est la vésicule anale développée, observée aussi chez d'autres Braconidés et disparaissant une vingtaine d'heures avant la nymphose avec développement concomitant des glandes séricigènes. Cette vésicule anale posséderait un rôle respiratoire. La larve de *C. plutellae* se nourrit des fluides de son hôte, certains nutriments pouvant être captés par osmotrophie (Quicke, 1997).

Carte 2 : Aire de répartition de *Cotesia plutellae* (Kurdjumov)

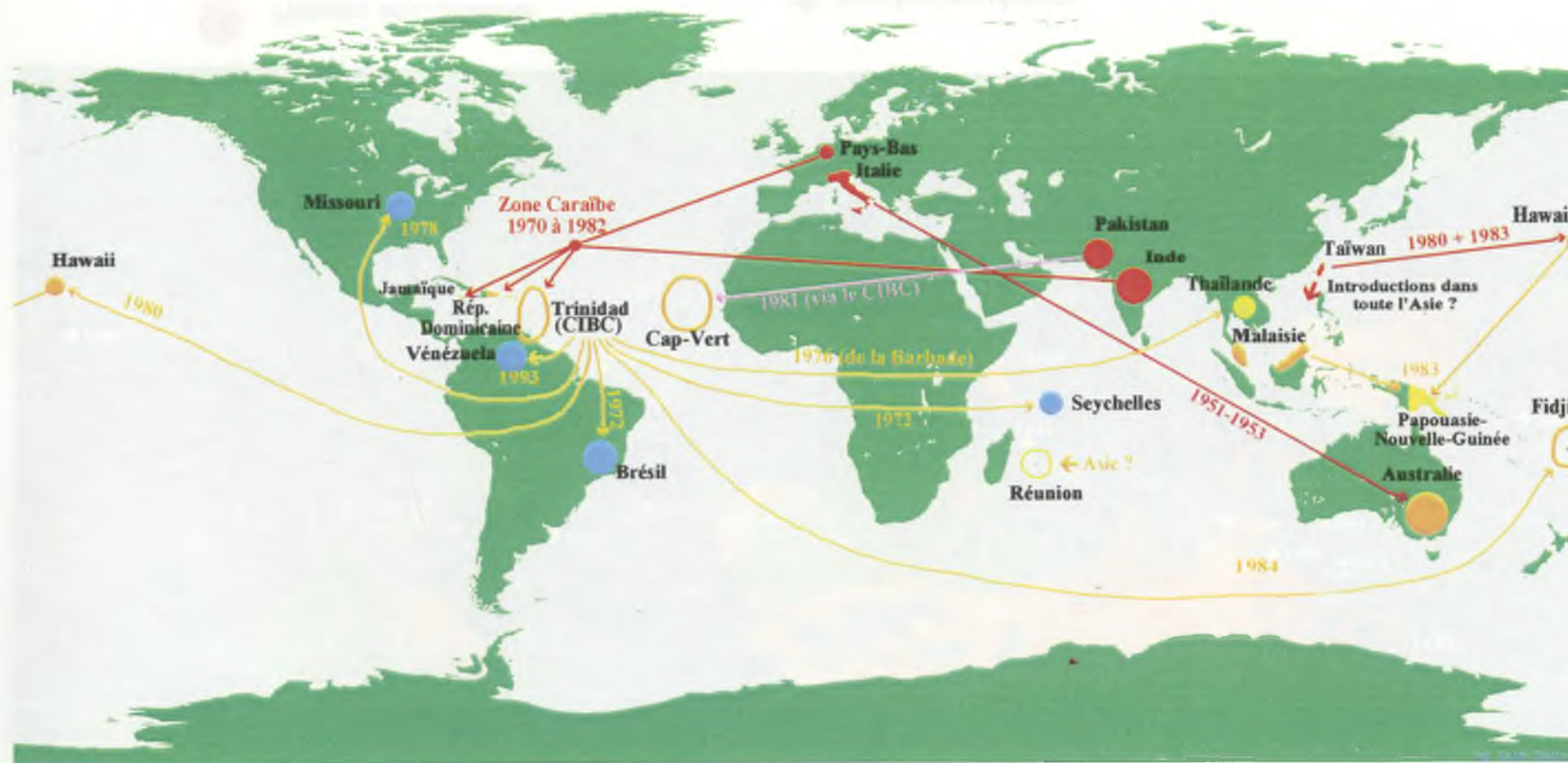


- Présence de *C. plutellae*
- Présence probable
- Introductions à résultat incertain

➔ Introductions réussies

1910 : première observation mentionnée dans la littérature

Carte 3 : Introductions recensées de *Cotesia plutellae* (Kurdjumov)



- Pays d'origine de *C. plutellae*
- Pays de première génération d'introduction
- Pays de seconde génération d'introduction
- Introductions à résultat incertain
- 1972 : Dates d'introductions

Nymphe et cocon : après émergence de la dépouille de la chenille-hôte mourante (fig. 2-2e), la larve tisse son cocon juste à côté. Ce cocon est blanc-jaune (fig. 2-2f), à aspect soyeux (il diffère ainsi des cocons d'*Apanteles* qui sont blancs, à aspect plus parcheminé). La nymphe se colore et se chitïnise progressivement, avec séparation des appendices qui deviennent bien visibles, plaqués contre le corps (fig. 2-2g).

Il y a désaccord sur le nombre et l'aspect des phases du développement larvaire de *C. plutellae*. Talekar & Lin (1998) parlent d'œufs atteignant une longueur de 250 µm 5 heures après l'oviposition et grossissant jusqu'à une longueur de 400 µm 24 h après oviposition ; il y aurait trois stades larvaires selon ces auteurs. En fait le nombre exact de stades larvaires reste inconnu car les critères choisis pour séparer les stades varient : on utilise généralement la longueur et la structure des mandibules, mais aussi les changements dans la forme de la larve au cours de son développement, et certaines de ces modifications ont une évolution continue, nécessitant donc de fixer arbitrairement les limites entre stades développementaux. A l'origine les Hyménoptères auraient cinq stades larvaires mais des réductions de ce nombre peuvent être apparues au cours de l'évolution. Cependant les quelques Braconidés étudiés en détail auraient cependant encore conservé les cinq stades larvaires originels (Quicke, 1997).

II.3.4 - Biologie

II.3.4.1 - Comportement reproducteur

L'accouplement peut se produire dès l'émergence des individus. Le mâle possède un comportement de cour succinct, qui consiste en des vibrations des ailes. Il affiche ce comportement dès qu'il entre en contact avec un congénère, celui-ci le rejetant ou s'éloignant s'il s'agit d'un mâle ou d'une femelle non réceptive. S'il s'agit d'une femelle prête à l'accouplement, le mâle lui saute sur le dos, s'accroche à elle, couple ses pièces génitales à celles de la femelle et se laisse pendre en arrière. La fécondation est très brève puisqu'elle dure moins de 10 secondes et est pour cette raison difficile à observer. Après cela les deux partenaires se séparent.

La femelle commence à pondre au cours des 24 heures qui suivent. Dans la nature, elle repère les choux attaqués par l'odeur caractéristique qu'ils émettent (Bogahawatte & van Emden, 1997 ; Potting *et al.*, 1999), car les feuilles des plantes attaquées par des chenilles modifient le spectre chimique des composés volatils qu'elles produisent, avec émission de kairomones (Turlings *et al.*, 1990 ; de Moraes *et al.*, 1998). Ce phénomène est déclenché par l'action de la salive du ravageur, dont certains composés agissent comme des éliciteurs des défenses de la plante (Alborn *et al.*, 1997 ; Thaler, 1999). Le signal chimique ainsi activé attire spécifiquement les parasitoïdes du ravageur en train d'attaquer la plante, ce qui permet une protection plus efficace de cette dernière (Turlings *et al.*, 1995).

Une fois posée sur des choux attaqués, la femelle de *C. plutellae* commence à chercher activement les chenilles sur les feuilles. Son activité est alors très erratique : au laboratoire on peut voir la femelle se nettoyer pendant de longues minutes avant de se mettre en chasse et attaquer quelques chenilles, puis redevenir longuement inactive. Les chenilles sont parasitées au cours des déplacements des femelles, lorsqu'il y a contact avec la proie. Les chenilles touchées ont alors un réflexe de fuite excitant *C. plutellae* qui peut les piquer en moins d'une demi-seconde. Son efficacité n'est pas absolue : d'un côté les chenilles restant parfaitement immobiles sont épargnées, et de l'autre les grandes chenilles sont parfois assez rapides pour échapper au parasitoïde. Cette rapidité de fuite est surtout le cas des L4, plus grosses et plus agiles, ce qui explique pourquoi elles sont rarement parasitées à ce stade (Lloyd, 1940).

Il existe cependant des différences entre les populations de *C. plutellae* au niveau de leurs préférences alimentaires : la population décrite par Talekar & Yang (1991) à Taïwan attaque le stade L4, mais ce n'est pas le cas des populations observées par Velasco (1982) aux Philippines ou par Mushtaque & Mohyuddin (1987) au Pakistan.

Globalement, *C. plutellae* est donc capable d'attaquer tous les stades larvaires de *Plutella xylostella*, mais avec une nette préférence pour les stades L2 et L3.

Il faut remarquer que *C. plutellae* est une espèce légèrement atypique au sein de son genre. La plupart des espèces de *Cotesia* sont en effet grégaires, c'est-à-dire que la femelle pond de multiples œufs (de 300 à plus de 1 000) au sein d'une chenille-hôte (Clausen, 1940). Ces espèces grégaires attaquent pour cela des Macrolépidoptères : c'est par exemple le cas de *Cotesia congregata* (Say) (Hym. : Braconidae) parasitant la chenille du sphinx *Manduca sexta* (L.) (Lep. : Sphingidae), où elle peut injecter plus de 200 œufs. Dans ce cas précis la chenille-hôte atteint une longueur de 10 cm à la fin de son développement (Beckage, 1998c). Quelques autres espèces sont parthénogénétiques.

Cotesia plutellae est par contre un endoparasite solitaire attaquant un Microlépidoptère qui ne fournit les ressources nutritives que pour une seule larve de parasitoïde. Une femelle ne pond donc qu'un œuf à la fois dans l'hôte. Dans le cas d'un superparasitisme, où plusieurs œufs sont pondus par différentes femelles dans le même hôte, il y a compétition et destruction des parasitoïdes surnuméraires. C'est généralement la première larve à éclore qui détruit les autres œufs chimiquement (Vinson & Hegazi, 1998), sinon il peut y avoir confrontation physique (Delucchi *et al.*, 1954). Le superparasitisme n'est pas rare dans la nature car les femelles de *C. plutellae* ne font pas la différence entre les chenilles déjà parasitées et les chenilles non attaquées (Lloyd, 1940) : il n'y a pas de phéromone de marquage comme on l'observe chez d'autres Hyménoptères (Mackauer, 1990). Ce superparasitisme conduit parfois à la mort prématurée de la chenille qui est épuisée par les modifications physiologiques qu'entraînent ces combats dans son corps.

Figure 2-2 : *Cotesia plutellae* (Kurdjumov)

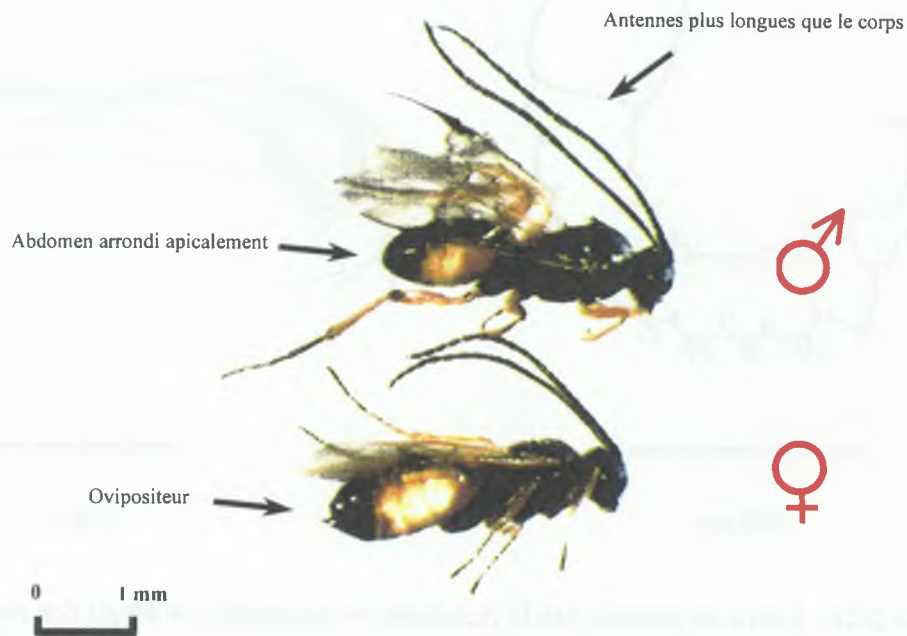


Figure 2-2a : Couple de *Cotesia plutellae*

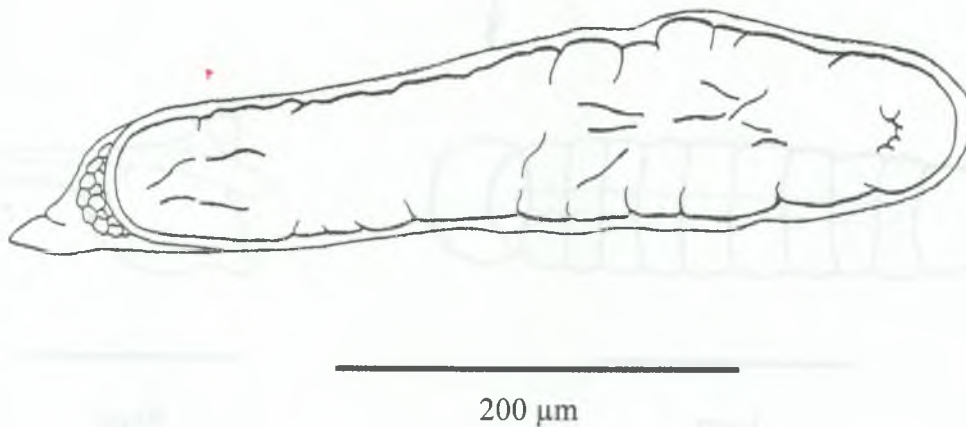


Figure 2-2b : Œuf de *Cotesia plutellae* après 30 h de développement.
(d'après Delucchi *et al.*, 1954 ; fig. 1, p. 31)

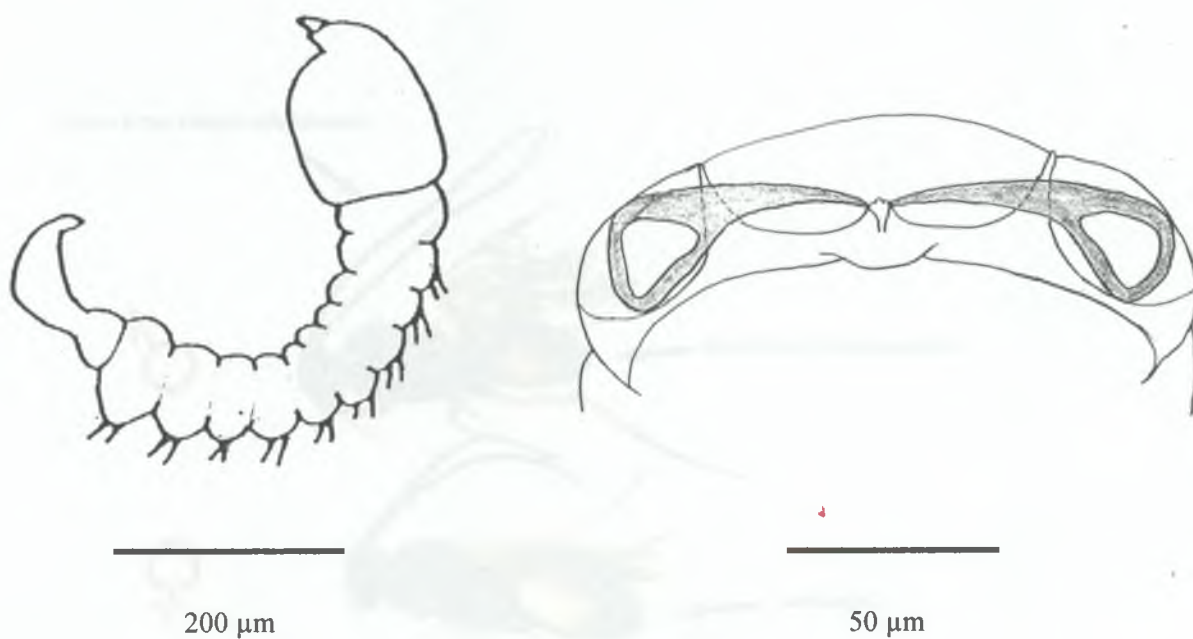


Figure 2-2c : Larve de premier stade (schématisée à gauche), et détail des mandibules (à droite, en grisé) (d'après Talekar & Lin, 1998, fig. 6.1, p. 24 ; Delucchi *et al.*, 1954)

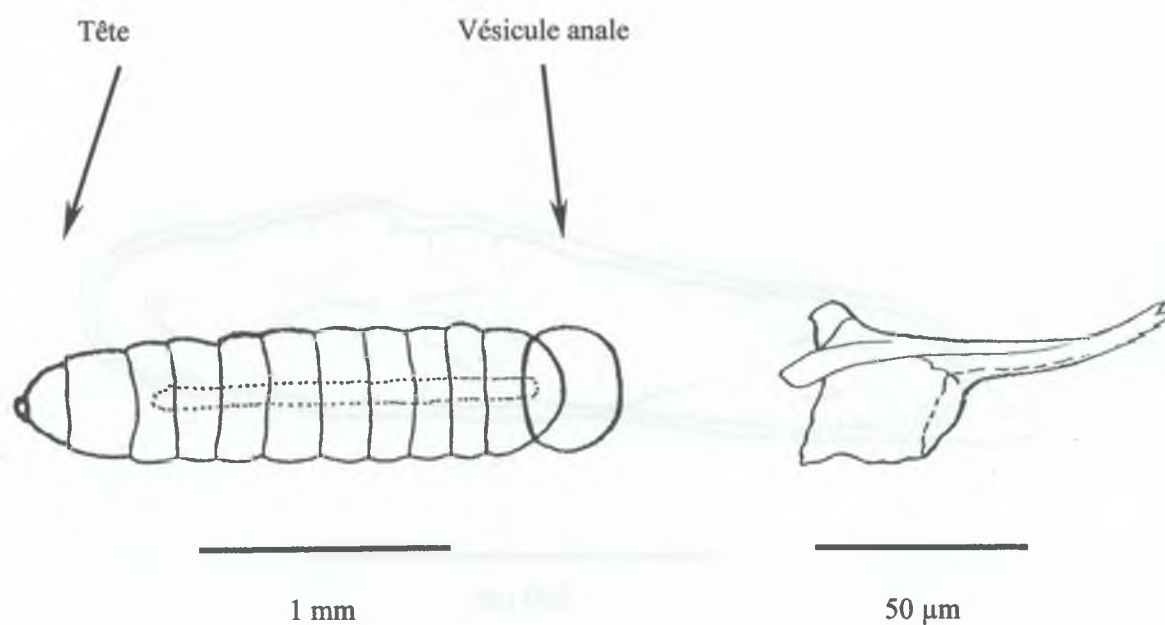


Figure 2-2d : Larve de dernier stade (à gauche) et détail des mandibules (à droite) (d'après Talekar & Lin, 1998 ; Delucchi *et al.*, 1954)



Figure 2-2e : Larve de *Cotesia plutellae* en fin de développement, émergeant de la chenille-hôte mourante, et commençant à tisser son cocon (x 16)



Figure 2-2f : Cocon de *Cotesia plutellae* (x 6)



Figure 2-2g : Quelques phases du développement nymphal de *Cotesia plutellae* (x 25)

A droite : jeune nymphe (moins de 12 heures)

Au centre : nymphe âgée de un jour et demi, avec la tache oculaire visible

A gauche : nymphe à 2,5 jours, avec les appendices visibles. Nymphé mâle, les antennes dépassant la longueur du corps.

II.3.4.2 - Développement

Les durées de développement (à 25 °C) sont données par Delucchi *et al.* (1954).

Oeuf	36-38 h
Larve de premier stade	1,5 j
Larve de second stade	4 j
Nymphe	4,5 j

La durée moyenne du développement embryonnaire et larvaire à 25 °C est de 8 jours. 90 % des larves tissent leur cocon au cours des 7 à 9 jours suivant l'oviposition (extrêmes : 6 et 11 jours).

La durée moyenne du développement complet, de la ponte de l'œuf à l'émergence de l'adulte, est de 13,5 jours, s'étendant de 11 à 16 jours. La variation dans la durée du développement complet suit la variation du développement larvaire.

Cependant plusieurs autres auteurs signalent des valeurs un peu différentes :

Oh *et al.* (1997) donnent une durée de développement larvaire de 117,7 °C-j (seuil thermique 12,3 °C) et de développement nymphal 64,7 °C-j (seuil 12,4 °C) pour une population coréenne (à 25 °C les durées respectives de développement sont donc de 9,3 et 5,1 jours) tandis que Shi & Liu (1999) donnent des valeurs respectivement de 105,6 °C-j et 62,0 °C-j (seuils 10,6 et 11,8 °C) pour une population chinoise (correspondant pour 25 °C à des durées respectives de développement de 7,3 et 4,7 jours). Le calcul en degrés-jours est basé sur la formule : $DJ = (\theta_e - \theta_s) \times t$, où DJ est le nombre de degrés-jours, θ_e la température (constante) d'élevage de l'insecte (en °C), θ_s le seuil de développement (où l'insecte survit sans qu'il puisse y avoir croissance) et t la durée de développement (en jours).

Hirashima *et al.* (1990) donnent un développement ovo-larvaire moyen de 8,8 jours et nymphal de 5,0 jours sur le terrain (à une température variable non précisée, probablement proche de 25 °C en moyenne).

Les adultes vivent généralement une à deux semaines (Verkerk & Wright, 1996). La sex-ratio est en faveur des mâles (1,2:1) selon Chua & Ooi (1986) mais les observations faites à l'île de la Réunion révèlent un résultat opposé (cf. chap. III). Il est très variable en fait d'une expérimentation à l'autre mais globalement *C. plutellae* semble produire autant de mâles que de femelles.

Quel que soit le stade de la chenille attaquée, qu'elle soit proche de la nymphose ou au début de sa croissance, la larve du parasitoïde aura un temps suffisant pour se développer grâce à un ralentissement de la croissance de son hôte. La durée de développement de la chenille étant habituellement de l'ordre de 8 jours à 25 °C, en théorie seules des chenilles attaquées peu de temps après leur éclosion vivraient assez longtemps pour autoriser le

développement complet de son parasitoïde. Or toutes les chenilles attaquées (excepté les chenilles de stade L4 avancé) restent à l'état larvaire suffisamment longtemps pour autoriser le développement complet du parasitoïde. Ce ralentissement de croissance est probablement l'un des effets du virus symbiote de *C. plutellae*, indispensable à la réussite du parasitisme (voir chap. V).

La femelle de *C. plutellae* dispose de 2 paires d'ovarioles soudées deux à deux (fig. 2-3), contenant déjà 40 à 60 œufs à l'émergence du cocon et un maximum de 130 œufs une semaine après l'émergence (Sakanoshita *et al.*, 1987). Oh *et al.* (1997) parlent de 180 à 300 œufs, Talekar & Lin (1998) de 200 œufs, par comptage des ovocytes présents dans la lumière des ovarioles. Mais la fécondité réelle totale d'une femelle semble cependant inférieure à 100 descendants (Chua & Ooi, 1986 ; obs. pers.), pour une durée de vie de l'ordre de deux semaines. Selon Hirashima *et al.* (1990) la fécondité de populations japonaises en conditions naturelles est même de seulement 30 descendants/femelle.

II.3.5 - Elevage de *Cotesia plutellae*

Cotesia plutellae restant un parasitoïde très spécifique, son élevage nécessite tout d'abord de disposer de chenilles de l'hôte *P. xylostella* en abondance. Ces dernières sont élevées sur choux, l'utilisation de milieux artificiels s'avérant chez cette espèce tout aussi contraignante que l'emploi de plantes entières. Cela présente en outre le risque d'altérer trop fortement les caractéristiques biologiques des populations ainsi élevées (Ortiz *et al.*, 1999).

L'élevage des chenilles de *P. xylostella* est réalisé sur des choux, à 25 °C, avec une photopériode de 16 heures de jour et 8 heures d'obscurité et une hygrométrie de l'ordre de 60 %. On donne aux femelles des feuilles de chou moutarde de Chine, un cultivar qu'elles apprécient tout particulièrement. Elles pondent alors sur les feuilles-support mises à leur disposition durant 24 h puis on retire ces feuilles pour les remplacer par d'autres. Après 3 jours, quand les chenilles néonates éclosent, on applique ces feuilles sur celles d'un chou pommé entier et les chenilles se déplacent vers cette nourriture fraîche. S'il y a trop de chenilles, on peut les transférer de nouveau sur un chou frais en coupant les feuilles de l'ancien chou et en les redéposant sur le nouveau. Dans les trois derniers jours de leur développement, on décortique le chou, on place les chenilles dans des boîtes grillagées et on les nourrit avec des feuilles fraîches jusqu'à leur nymphose. Les papillons qui émergent des nymphes ainsi récoltées sont placés avec le reste de la population dans les cages de ponte. Les adultes ont à leur disposition de l'eau et des gouttes de miel, car le fait de pouvoir se nourrir augmente leur longévité et leur fécondité (Salinas, 1986a).

Au laboratoire la production de nouveaux individus de *C. plutellae* est basée sur une capacité des femelles à parasiter une dizaine de chenilles par jour, tout en maintenant en permanence une population de quelques dizaines d'individus en élevage.

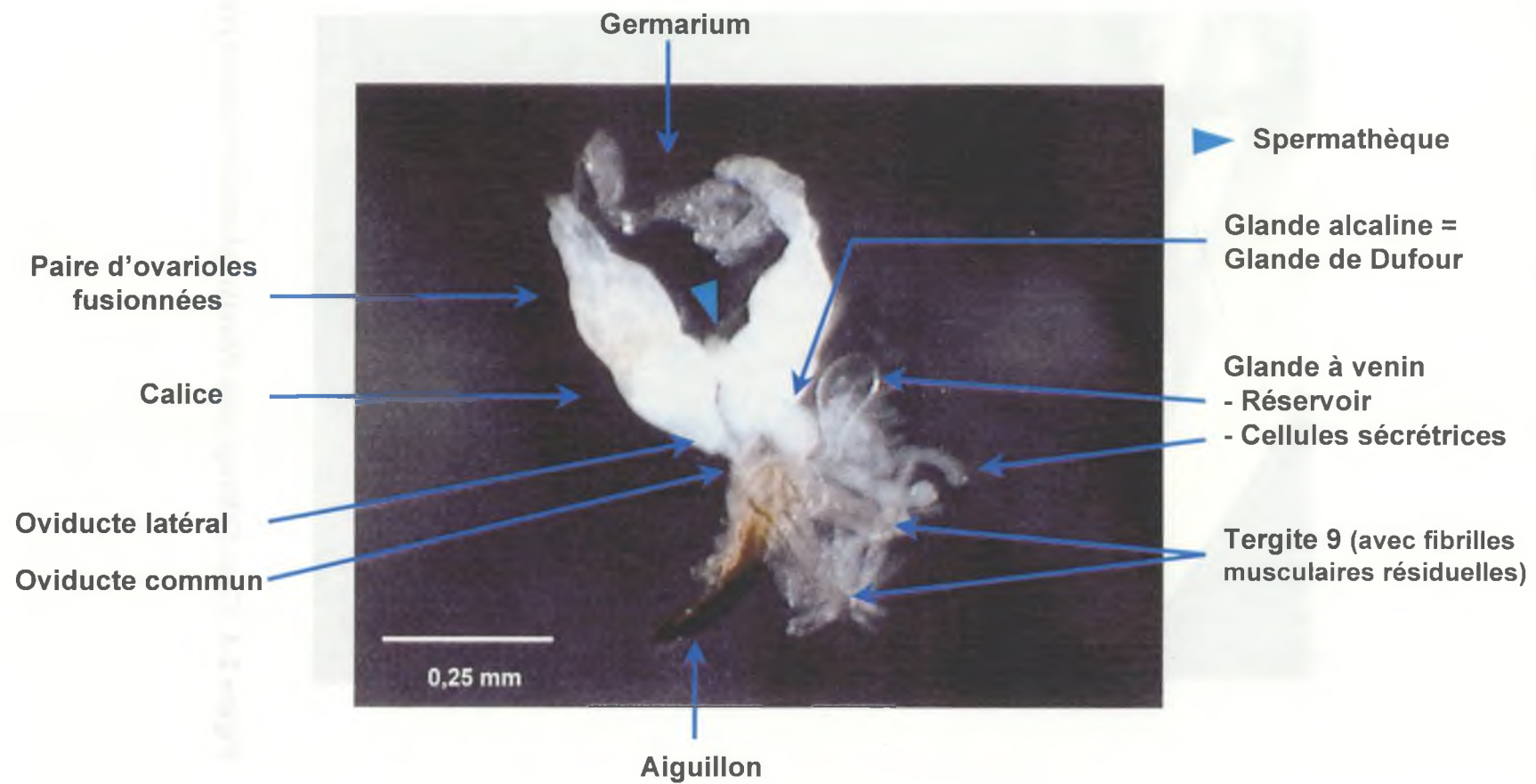


Figure 2-3 : Appareil génital femelle de *Cotesia plutellae*

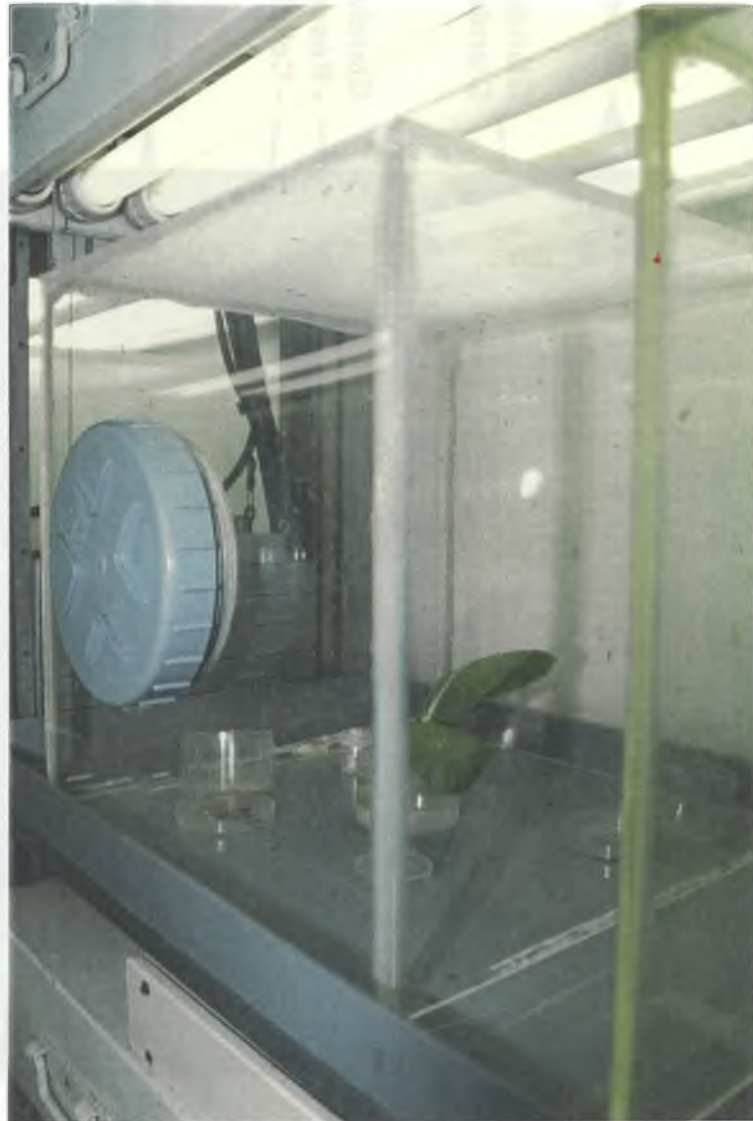


Figure 2-4 : Cage d'élevage pour *Plutella xylostella* et *Cotesia plutellae*

En se basant sur une cinquantaine d'individus reproducteurs et une sex-ratio de 1:1 environ, il faut donc pouvoir disposer de 250 chenilles de *P. xylostella* par jour. On utilise des jeunes chenilles (stade L2) que *C. plutellae* pique sans difficultés et qui ne s'éparpillent pas trop dans la cage de ponte. Il suffit de couper une ou plusieurs feuilles des choux

de *P. xylostella* portant le nombre de chenilles désirées, de plonger leur tige dans un godet d'eau (bien refermé autour du pétiole des feuilles, sinon les femelles du Braconidé, lors de leur exploration du support, risquent d'entrer dans le godet et de se noyer) et de les déposer dans la cage des parasitoïdes pendant 24 heures (fig. 2-4). On peut ajouter aussi une feuille supplémentaire disposée de manière à toucher le sol de la cage. En effet, les chenilles dérangées lors des déplacements de *C. plutellae* se laissent tomber ou se suspendent au bout d'un fil pour se protéger et ne peuvent pas toujours remonter. Elles vont alors s'abriter sous cette feuille supplémentaire plus facile d'accès.

Après retrait de la cage, les feuilles porteuses des chenilles parasitées sont déposées sur un chou entier, en pot. Celui-ci est pris suffisamment gros pour leur permettre d'achever leur développement sans nécessiter de transfert vers une nouvelle source de nourriture. On évite ainsi des manipulations supplémentaires susceptibles de blesser les chenilles. Après 8 jours (à 25 °C) il suffit de décortiquer le chou pour récupérer les cocons formés. Les chenilles retardataires (un ou deux jours de plus sont parfois nécessaires) sont élevées dans une boîte avec des feuilles de chou coupées, jusqu'à la nymphose. Le rendement global est de l'ordre de 30 à 60 % de chenilles donnant des cocons viables, ce résultat étant variable d'un jour à l'autre. Il y a en effet de multiples facteurs de perte : mortalité des chenilles parfois trop parasitées si plusieurs *C. plutellae* les ont attaquées ; à l'opposé chenilles ayant évité les attaques ; des larves de *C. plutellae* n'arrivent pas à émerger ou à tisser leur cocon et finalement quelques nymphes meurent ou donnent naissance à des imagos malformés.

Ces nouveaux individus sont ajoutés aux autres *C. plutellae* déjà en cage, pour maintenir le niveau de la population. Les excédents sont congelés pour les études biochimiques et génétiques. Une partie des femelles sont disséquées pour récupérer leurs ovaires et le polydnavirus symbiote qu'ils renferment.

Il n'y a pas de populations élevées en permanence au laboratoire, à cause des problèmes de dérive génétique qui apparaissent au fil du temps. L'élevage des souches dure juste le temps de récupérer suffisamment de matériel génétique pour les analyses, puis est stoppé. La durée de maintien est de l'ordre de trois mois, représentant ainsi quatre à cinq générations tout au plus. Pour les études biologiques, nécessitant du matériel vivant, nous utilisons préférentiellement des souches envoyées du Bénin ou de l'Ile de la Réunion, car il nous a été possible de faire collecter à peu près toute l'année des échantillons importants dans ces régions pour régénérer les populations du laboratoire.

II.4 - *Cotesia plutellae*, espèce unique ?

II.4.1 - Introduction

Cotesia plutellae est un parasitoïde très spécifique de *P. xylostella*. Ceci est lié à la propre spécificité alimentaire de son hôte, qui ne se nourrit que de Brassicacées et a dû s'adapter en conséquence à la phytochimie particulière de cette famille végétale. Il s'est ainsi constitué un complexe tritrophique très spécialisé (Potting *et al.*, 1999) où *C. plutellae* s'est adapté à la détection de son hôte par l'intermédiaire de l'odeur caractéristique du chou endommagé par les chenilles de *P. xylostella* (Bogahawatte & van Emden, 1997). Il existe toutefois quelques exceptions à cette spécificité et *C. plutellae* a été observé dans de rares cas sur d'autres hôtes :

- Wilkinson (1939) signale comme hôte certain du parasitoïde la "Petite Tortue" *Aglais urticae* L. (Lep. : Nymphalidae), mais considère comme douteuses la majorité des observations antérieures, liées à des erreurs de détermination.

- Delucchi *et al.* (1954) le signalent comme régulièrement observé sur *Hypantria cunea* Drury (Lep. : Arctiidae) en (ex-)Yougoslavie.

- Ce serait un parasitoïde courant de *Ocnogyna baetica* (Rambur) (Lep. : Arctiidae) en Espagne (Lipa *et al.*, 1993) et on le trouve sur *Plusia gamma* (L.) (Lep. : Noctuidae) au Japon (Potting *et al.*, 1999).

- Finalement Cameron *et al.* (1997) ont pu le forcer à pondre sur une quinzaine de Lépidoptères en laboratoire, même si le développement complet ne s'est produit que chez quelques-unes de ces espèces et en faible proportion.

Mais ces cas restent isolés, des erreurs d'identification n'étant d'ailleurs pas à exclure, et malgré les multiples introductions dont *C. plutellae* a fait l'objet il n'a jamais été signalé comme attaquant d'autres espèces-hôtes autochtones sur les lieux de lâcher, à la différence d'autres parasitoïdes (cf. chap. III).

En dehors de ces observations d'hôtes alternatifs, il existe aussi des différences entre les populations de *C. plutellae*, que l'on peut observer facilement au niveau de l'efficacité parasitaire :

- Ainsi *C. plutellae* est un parasitoïde performant en Afrique du Sud, avec un taux de parasitisme atteignant parfois 100 %, et il assure une régulation efficace de *P. xylostella* (Smith & Villet, 1999 ; Waladde *et al.*, 1999).

- Au Bénin, où il est la seule espèce présente dans les régions côtières, son taux de parasitisme atteint 80 % certains mois de l'année, mais n'assure pas un contrôle suffisant de *P. xylostella*.

- A la Réunion, c'est un parasitoïde abondant mais pas autant qu'une espèce locale de *Diadegma* (cf. chap. III).

- Au Brésil, c'est une espèce qui était fréquemment observée (Barbosa & França, 1981 ; Monnerat, 1995), mais qui est actuellement devenue très rare (cf. chap. III).

Plus encore, comme noté au § II.3, plusieurs auteurs observent des valeurs différentes pour des caractéristiques biologiques telles que la fécondité ou la durée de développement. Au Japon, les populations nordiques de *C. plutellae* subissent une diapause, à l'inverse des populations méridionales (Alvi & Momoi, 1994). Des différences morphologiques existent également dans certaines populations, telles celles du Bénin, d'aspect plus gracile (Delvare, comm. pers.) ou encore les populations d'Afrique du Sud où apparaîtraient des morphes saisonniers de couleur (Kfir, 1997).

Sur la base de telles variations biologiques de *C. plutellae*, essentiellement sa spécificité non absolue pour *P. xylostella*, Fitton et Walker (1992) ont émis l'hypothèse de l'existence de deux espèces de parasitoïdes (l'une à Taïwan et l'autre aux Philippines). Ces auteurs ont même avancé l'idée que *C. plutellae* pourrait avoir été mal identifié et qu'il s'agirait de l'espèce *Cotesia vestalis* Haliday (Hym. : Braconidae).

On peut soulever plusieurs objections à cette hypothèse :

- Concernant les variations d'efficacité en milieu naturel, on peut simplement constater que les conditions d'observations ne sont jamais les mêmes : climats différents, présence de compétiteurs et d'hyperparasites en plus ou moins grand nombre, plantes-hôtes de *P. xylostella* variables sont quelques-uns des nombreux paramètres pouvant entrer en jeu. Or le taux de parasitisme peut déjà varier à quelques kilomètres d'intervalle (cf. chap. III) et il est donc encore plus difficile de comparer des populations de pays différents.

- On a observé dans les élevages du laboratoire que les différentes populations de *C. plutellae* élevées au fil des ans, provenant d'une dizaine de pays différents, ont toujours accepté de pondre sur les chenilles de *P. xylostella* qui leur étaient offertes et qui venaient elles-mêmes de localités différentes. Il s'agit cependant d'observations qualitatives, des mesures de taux de parasitisme effectif n'ayant pu être effectuées avec un degré de précision suffisant.

Malgré ces objections le doute peut subsister et il a donc été nécessaire de mener des expériences pour éclaircir ce point. L'existence d'un complexe d'espèces peut théoriquement être facilement vérifié, puisque par définition des espèces distinctes ont développé un isolement reproducteur et ne peuvent plus être interfécondes.

Afin de vérifier la possible absence d'interfécondité, une série de croisements a donc été tentée afin d'observer les éventuelles incompatibilités entre les populations testées, qui pourraient de ce fait laisser supposer l'existence d'un complexe "*C. plutellae*" au lieu d'une espèce unique.

II.4.2 - Protocole

Des populations originaires de Taïwan (région de Tainan), du Bénin (zone périurbaine de Cotonou) et de l'île de la Réunion (à Montvert-les-Hauts) ont été utilisées pour les croisements. Ces populations présentent l'intérêt de venir de trois endroits distincts, très éloignés géographiquement, où aucune introduction volontaire n'a été signalée. Des cocons de chacune de ces populations ont été séparés dans des capsules avant émergence, et des couples hybrides ont été constitués à partir de ces individus vierges. Il faut non seulement réaliser des combinaisons [Taïwan x Bénin] ; [Taïwan x Réunion] et [Bénin x Réunion] mais aussi croiser des mâles et des femelles de chaque population car des stérilités sexe-spécifiques liées à l'existence de bactéries *Wolbachia* ne sont pas à exclure (Rigaud & Rousset, 1996 ; Quicke, 1997).

Les couples hybrides ont été laissés 24 heures ensemble, puis on commence à donner 10 chenilles à parasiter à chaque femelle. Les chenilles sont retirées chaque jour et remplacées par de nouvelles, durant toute la vie de la femelle. Les chenilles parasitées sont ensuite élevées jusqu'à l'obtention de cocons.

Le mode de reproduction haplodiploïde de *C. plutellae* fait que les femelles non fécondées peuvent engendrer des mâles, non hybrides et on ne peut être sûr de la fécondation de ces femelles que si obtient une descendance elle-même femelle. De plus une incompatibilité peut ne se révéler qu'à la génération suivante (F2), car il est possible d'obtenir des hybrides F1 entre espèces non interfécondes mais ces hybrides sont alors stériles : c'est le cas des mules et des mulets par exemple. Des couples sont donc constitués à partir des individus obtenus des cocons F1 afin d'obtenir une génération F2 et vérifier ainsi qu'on obtient une descendance. Là encore, la présence de femelles permettra de vérifier qu'il y a bien eu fécondation au sein du couple F1 et qu'il n'était donc pas stérile.

II.4.3 - Résultats

Seuls des résultats très partiels ont pu être obtenus car, à l'époque où les expériences ont été menées, les populations du laboratoire étaient contaminées par des Microsporidies (une espèce du genre *Vairimorpha* a été décrite par Haque *et al.* (1999) chez *P. xylostella*), amenés par une population de *P. xylostella* malaisienne où ce pathogène est naturellement présent (il est aussi connu du Vietnam et de la Thaïlande). Ces pathogènes se sont propagés au sein des élevages, probablement par l'intermédiaire des spores résistantes et contaminantes.

Les Microsporidies affaiblissent considérablement les populations d'insectes porteuses de ces pathogènes, mais ne les tuent pas complètement. D'ailleurs *P. xylostella* reste un ravageur important dans les régions où ces nosémoses se produisent, aidé cependant

par l'apport d'individus migrants sains. Mais si une partie des chenilles malades, affaiblies, arrivent à compléter leur cycle, elles ne peuvent résister à la charge supplémentaire induite par l'attaque d'un parasitoïde : toutes les chenilles "nosémosées" ainsi piquées meurent et les larves de la guêpe également car elles ne disposent pas de suffisamment de temps pour achever leur développement (Bordat et al., 1994). La mortalité des chenilles est alors aussi élevée que si les parasitoïdes avaient pu émerger de leur corps, mais dans ce cas il n'y a plus un seul parasitoïde à la génération suivante, ce qui n'est pas vraiment souhaitable en matière de contrôle biologique. C'est pourquoi les essais d'introduction de microsporidies dans des zones saines actuellement envisagés pour réguler les populations de *P. xylostella* (Haque et al., 1999) risquent d'aggraver la situation plutôt que de l'améliorer.

Les microsporidies sont très difficiles à éliminer d'un élevage car elles ont une transmission verticale intra-ovarienne : une population contaminée l'est définitivement, les antibiotiques étant inefficaces et les antifongiques ne fonctionnant pas dans tous les cas. On peut cependant maintenir une population d'hôte en relativement bonne santé par sélection des individus les plus sains en élevage et par passage au froid pour ralentir le développement de certaines microsporidies (Bordat et al., 1984). Le seul remède vraiment efficace reste cependant la suppression des populations contaminées et leur remplacement après désinfection des locaux d'élevage.

Dans le cas de ces croisements, la contamination n'était pas encore très importante, ce qui a permis de commencer les premières séries de manipulations avant la perte des populations de parasitoïdes. Le nombre de microsporidies augmente à chaque génération d'élevage (Gruarin, 1998), jusqu'à rendre inutilisables les chenilles à la troisième ou quatrième génération après la première infestation. On peut donc utiliser des chenilles durant un à deux mois après obtention de populations saines du terrain.

Les quelques résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 2-6.

II.4.4 : Discussion

- La première série d'expériences s'est effectuée avec les populations du Bénin et de la Réunion et s'est déroulée lors d'une période où le niveau d'infestation par les microsporidies était plus faible. Nous avons alors pu obtenir un taux de parasitisme de l'ordre de 20 %, inférieur cependant au taux de parasitisme obtenu avec des populations saines. Dans le cadre de ce croisement on a obtenu quelques dizaines de mâles et de femelles hybrides pour les générations F1 et F2 : l'interfécondité de ces deux populations semble avérée.

- Les séries d'expériences suivantes se sont déroulées dans les semaines qui ont suivi la première série mais ce laps de temps est suffisant pour que la concentration des

microsporidies dans les chenilles de *P. xylostella* augmente fortement. Avec ces chenilles très affaiblies, on n'obtient qu'un taux de parasitisme inférieur à 10 % et si des mâles et des femelles ont pu être obtenus pour la génération hybride F1, la génération F2 fut quasiment inexistante, ce qui empêche d'affirmer avec certitude qu'il existe une interfécondité lors des croisements [Taïwan x Bénin] ou [Taïwan x Réunion]. Cependant l'obtention d'une femelle F2 lors du croisement (CPTm x CPBf) et de quelques mâles pour les autres combinaisons laisse supposer que ces populations sont au moins légèrement interfécondes.

Cette opinion est renforcée par le résultat des analyses biochimiques détaillées dans le chapitre IV. Ces résultats montrent que les populations les plus éloignées génétiquement d'après leurs profils isoenzymatiques sont justement celles du Bénin et de la Réunion, or la combinaison [Bénin x Réunion] est celle où l'interfécondité est la mieux confirmée. On peut supposer que les autres croisements, réalisés entre populations génétiquement moins différentes, auraient donné aussi des résultats positifs et que ces trois populations appartiennent bien à la même espèce *Cotesia plutellae*.

La grande ressemblance entre les profils de restriction obtenus à partir de l'ADN du polydnavirus symbiote dans les trois populations est aussi un argument en faveur de l'appartenance de celles-ci à la même espèce (cf. chap. V).

La diversité génétique des autres populations n'est pas connue et nous ne pouvons exclure l'existence d'espèces distinctes dans d'autres régions, telles le continent américain. Cependant, comme de multiples populations de *C. plutellae* signalées dans le monde sont issues d'introductions relativement récentes, tout spécialement celles des Amériques, il est peu probable que l'on ait affaire à d'autres espèces dans ces conditions puisqu'elles dérivent très souvent d'un même petit groupe de populations (cf. carte 3). La question reste posée quand *C. plutellae* a été signalé sans qu'aucune introduction ne soit mentionnée. De nouvelles analyses biochimiques, portant sur d'autres populations collectées ailleurs dans le monde, devraient permettre de résoudre ces incertitudes.

L'appartenance à la même espèce n'exclut pas l'existence de différences de performances entre les populations, mais elles ne peuvent être mesurées ici : le nombre de couples testés a été trop réduit pour permettre de réaliser des analyses statistiques. Il faudra réaliser des expériences beaucoup plus complètes, sur un plus grand nombre d'individus, et surtout avec des populations de chenilles-hôtes saines, pour ne pas subir la forte réduction du taux de parasitisme engendrée par la présence de microsporidies. Ces expériences devraient maintenant être réalisables au sein du laboratoire grâce aux mesures de désinfection sévères qui portent leurs fruits.

Il faudra finalement sélectionner des populations "représentatives" lors de ces tests car le nombre de combinaisons de croisements possibles augmente considérablement avec le nombre de populations testées. Les analyses biochimiques citées plus haut pourraient

permettre d'effectuer une présélection utile : on effectuerait des croisements entre les populations les mieux séparées génétiquement, plus susceptibles de présenter aussi des différences plus affirmées en ce qui concerne leurs caractéristiques biologiques.

Tableau 2-6 : Résultats obtenus lors des croisements entre populations de *Cotesia plutellae*

Croisement	Conditions	F1 obtenue	Croisements F1	F2 résultante
CPBm x CPRf	5 couples	30 mâles	5 couples	39 mâles
	300 chenilles	30 femelles	180 chenilles	18 femelles
CPBf x CPRm	7 couples	52 mâles	5 couples	30 mâles
	500 chenilles	44 femelles	280 chenilles	15 femelles
CPTm x CPBf	5 couples	32 mâles	4 couples	1 mâle
	500 chenilles	28 femelles	160 chenilles	1 femelle
CPTf x CPBm	5 couples	4 mâles	1 couple	2 cocons
	500 chenilles	1 femelle	30 chenilles	
CPTm x CPRf	4 couples	45 mâles	4 couples	1 mâle
	600 chenilles	30 femelles	160 chenilles	
CPTf x CPRm	3 couples	1 mâle	6 femelles	2 mâles
	300 chenilles	7 femelles	240 chenilles	

Légende : CPB : *C. plutellae* du Bénin m : mâle
CPR : *C. plutellae* de la Réunion f : femelle
CPT : *C. plutellae* de Taïwan

Table 1. Summary of results from the 1990-1991 survey of the 100 most important species in the community		Number of species	
Number of species	Number of species	Number of species	Number of species
1-10	10	10	10
11-20	20	20	20
21-30	30	30	30
31-40	40	40	40
41-50	50	50	50
51-60	60	60	60
61-70	70	70	70
71-80	80	80	80
81-90	90	90	90
91-100	100	100	100
101-110	110	110	110
111-120	120	120	120
121-130	130	130	130
131-140	140	140	140
141-150	150	150	150
151-160	160	160	160
161-170	170	170	170
171-180	180	180	180
181-190	190	190	190
191-200	200	200	200
201-210	210	210	210
211-220	220	220	220
221-230	230	230	230
231-240	240	240	240
241-250	250	250	250
251-260	260	260	260
261-270	270	270	270
271-280	280	280	280
281-290	290	290	290
291-300	300	300	300
301-310	310	310	310
311-320	320	320	320
321-330	330	330	330
331-340	340	340	340
341-350	350	350	350
351-360	360	360	360
361-370	370	370	370
371-380	380	380	380
381-390	390	390	390
391-400	400	400	400
401-410	410	410	410
411-420	420	420	420
421-430	430	430	430
431-440	440	440	440
441-450	450	450	450
451-460	460	460	460
461-470	470	470	470
471-480	480	480	480
481-490	490	490	490
491-500	500	500	500
501-510	510	510	510
511-520	520	520	520
521-530	530	530	530
531-540	540	540	540
541-550	550	550	550
551-560	560	560	560
561-570	570	570	570
571-580	580	580	580
581-590	590	590	590
591-600	600	600	600
601-610	610	610	610
611-620	620	620	620
621-630	630	630	630
631-640	640	640	640
641-650	650	650	650
651-660	660	660	660
661-670	670	670	670
671-680	680	680	680
681-690	690	690	690
691-700	700	700	700
701-710	710	710	710
711-720	720	720	720
721-730	730	730	730
731-740	740	740	740
741-750	750	750	750
751-760	760	760	760
761-770	770	770	770
771-780	780	780	780
781-790	790	790	790
791-800	800	800	800
801-810	810	810	810
811-820	820	820	820
821-830	830	830	830
831-840	840	840	840
841-850	850	850	850
851-860	860	860	860
861-870	870	870	870
871-880	880	880	880
881-890	890	890	890
891-900	900	900	900
901-910	910	910	910
911-920	920	920	920
921-930	930	930	930
931-940	940	940	940
941-950	950	950	950
951-960	960	960	960
961-970	970	970	970
971-980	980	980	980
981-990	990	990	990
991-1000	1000	1000	1000

Table 1. Summary of results from the 1990-1991 survey of the 100 most important species in the community.

The results of the survey are presented in Table 1. The table shows the number of species in each of the 100 most important species in the community. The table is organized into 10 columns, each representing a different species. The rows represent the number of species in each column. The table shows that there are 100 species in the community, and that the number of species in each column is 100.

CHAPITRE III

Variabilité biologique : Etudes sur le terrain

STUDY OF THE
"STANDARD" PROBLEM

CHAPTER III

III.1 – Introduction

En dehors des études de laboratoire, concentrées sur la variabilité "intrinsèque", il fallait aussi observer les variations des populations de *C. plutellae* en milieu naturel, liées aux facteurs environnementaux. Nous avons choisi d'étudier l'espèce dans deux zones tropicales à climats bien distincts, afin de s'assurer la présence de conditions écologiques assez différentes. La première étude de terrain s'est déroulée dans la région de Brasilia, c'est-à-dire dans une zone de savane, durant l'hiver austral 1998. La seconde étude s'est quant à elle effectuée sur l'île de la Réunion, avec un climat océanique humide et où le relief peut jouer une grande importance, durant l'hiver austral 1999.

Il s'avère ainsi possible de comparer l'efficacité de *C. plutellae* et son intégration dans deux "complexes" (*P. xylostella* + ses ennemis naturels) différents. Dans un cas cette intégration du parasitoïde est ancienne, puisqu'il est observé à Brasilia depuis une vingtaine d'années (Barbosa & França, 1981) et dans l'autre cas elle est récente puisque l'espèce n'est connue à la Réunion que depuis 1995 (Bordat, comm. pers.).

Simultanément des données sur les populations de *P. xylostella* locales ainsi que sur les autres espèces de parasitoïdes en interaction avec *C. plutellae* seront collectées.

Pour éviter d'ajouter une variabilité expérimentale qui s'ajouterait à la variabilité liée à l'environnement, une uniformisation des conditions de manipulation s'est avérée nécessaire. Les pratiques culturales et les méthodes de collecte et de mesure ont donc été répétées d'un endroit à l'autre (Brésil et île de la Réunion).

III.2 – Matériel et méthodes

III.2.1 - Pratiques culturales :

On a utilisé des parcelles expérimentales plantées avec du chou pommé (*Brassica oleracea* var. *capitata*) dans tous les cas. Les cultivars ne sont pas identiques au Brésil et à la Réunion ("Kenzan" au Brésil, "Alta" à la Réunion), mais ont des caractéristiques proches : aspect, taille et développement similaires.

Les parcelles sont de taille similaire : 400 à 500 m², avec un millier de choux plantés dans chacune d'entre elles.

Les cultures sont menées en l'absence de traitements phytosanitaires, et également sans apport d'engrais. Ceci a permis d'observer le développement de *P. xylostella* et de son cortège de parasitoïdes avec le moins d'interférences possibles liées aux pratiques culturales, en particulier sans l'emploi d'insecticides qui détruisent bien souvent la majorité de la faune auxiliaire.

L'arrosage était réalisé par aspersion, à l'aide de "tourniquets", pour employer la technique la plus répandue.

III.2.2 - Echantillonnage :

Des prélèvements hebdomadaires ont été réalisés dans chaque parcelle, avec sélection aléatoire de 20 choux. Les choux étant plantés en lignes distinctes, il suffit de tirer 20 couples (x, y) de nombres aléatoires et de s'en servir comme coordonnées pour prélever les choux correspondants (x pour la ligne, puis y-ième chou sur cette ligne).

Les choux ainsi ramassés étaient complètement décortiqués au retour au laboratoire, avec récupération de toutes les chenilles des stades L2 à L4, des nymphes de *P. xylostella*, des cocons de parasitoïdes et des autres espèces de Lépidoptères prédateurs rencontrés. Les œufs de *P. xylostella*, et les L1, endophylles, sont omis dans l'échantillonnage.

Les chenilles de *P. xylostella* collectées sont séparées par stade phénologique et élevées jusqu'à la fin de leur développement pour observer l'émergence de papillons ou de parasitoïdes.

III.2.3 - Mesures

On a dénombré les parasitoïdes et hyperparasites rencontrés, avec conservation d'échantillons pour leur détermination par l'unité de faunistique du laboratoire Entotrop au Cirad à Montpellier. Ce même laboratoire conserve les spécimens ayant servi à ces déterminations pour ses collections de référence. La sex-ratio de certaines espèces de parasitoïdes a été calculée (dont *C. plutellae*).

III.2.3.1 - Enregistrement de données météorologiques :

Au Brésil deux thermohygrographes ont enregistré la température et l'humidité dans chaque parcelle, associés à une station météorologique automatique commune pour les données concernant le vent et les précipitations. A la Réunion, ce sont des stations automatiques situées à proximité des parcelles qui ont fourni les données.

III.2.3.2 - Analyses statistiques

Le test t de Student sur des séries d'effectifs appariées par semaine a été utilisé lorsque les mesures étaient le nombre d'individus collectés à chaque échantillonnage (cas de *P. xylostella* et de ses parasitoïdes les plus abondants). Ces valeurs étant soumises à une forte variabilité durant le développement des populations, une transformation en \sqrt{p} est opérée avant les tests pour fixer l'écart-type élevé trouvé dans ces analyses. Cette transformation est possible dans la mesure où les parasitoïdes de *P. xylostella* rencontrés dans ces études sont des espèces solitaires et à comportement de recherche aléatoire (Lloyd, 1940), les chenilles de *P. xylostella* étant elles-mêmes dispersées sur les choux (Salinas,

1984). Cependant ce sont les données non transformées qui seront indiquées dans les tableaux de résultats des tests t.

L'analyse directe des taux de parasitisme pour comparaison entre parcelles n'est pas possible car les échantillonnages n'ont pas une taille constante au cours du temps, évoluant en fonction des fluctuations des populations (E. Gozé, comm. pers.).

Cependant la préférence des parasitoïdes pour un stade donné des chenilles de *P. xylostella* a pu être effectuée à l'aide d'un modèle log-linéaire (procédure GENMOD sous SAS) (voir annexe 1).

III.3 - Brésil

III.3.1 - Introduction

Le travail a été effectué à l'Embrapa (**Empresa brasileira de pesquisa agropecuaria** = entreprise brésilienne de recherches agronomiques), dans deux de ses sections :

- l'Embrapa-Recursos genéticos e Biotecnologica (ex-Cenargen), à Brasília, pour le travail de laboratoire.

- l'Embrapa-Hortaliças (ex-CNPH) pour les cultures, situé à 30 kilomètres au Sud de Brasília (**carte 4**).

Ce travail s'est déroulé sur 8 mois, de mai à novembre 1998, mais la période effective de culture des choux s'est trouvée réduite à 6 mois et demi du fait d'un retard de l'arrivée de la saison sèche, cette année ayant été celle d'un phénomène "El Nino" perturbateur du climat local. Une culture de choux couvrant une période de près de 4 mois entre la plantation des jeunes pieds jusqu'à la récolte, il nous a été possible de réaliser sur une culture complète une étude des populations et de la poursuivre partiellement (aux deux-tiers) au cours d'une seconde culture. L'expérimentation n'a pas été poursuivie au delà car l'emploi d'un autre manipulateur aurait pu introduire un biais des résultats.

La région de Brasília (District Fédéral) est localisée sur l'immense plateau brésilien, à une altitude moyenne de 1 100 m pour la ville-même. Elle appartient écologiquement au biome des cerrados, c'est-à-dire une savane herbeuse avec une riche strate arbustive et arborée, sur sol ferralitique (de couleur rouge à cause de son abondance en oxyde de fer) (**fig. 3-1**) (Ratter *et al.*, 1997). Le climat y est contrasté, avec deux saisons distinctes (NOAA, 1998) :

- la saison sèche, qui s'étend d'avril à octobre et se caractérise au niveau de Brasília par une pluviométrie réduite (il tombe un total de précipitations de l'ordre de 100 mm en 6 mois, certains mois se passant sans une seule goutte de pluie) et une température moyenne de 22 °C. L'atmosphère est très sèche, l'hygrométrie atteignant même des minimales de 15 à 20 % en septembre (**tableau 3-1**).

- la saison humide, s'étendant de novembre à mars, est un peu plus chaude (24-25 °C), très pluvieuse (environ 1 000 mm, concentrant donc 90 % des précipitations de l'année) et très humide.

Les cultures agricoles se réalisent surtout durant la saison sèche, la pluie rendant difficile le travail des champs le reste de l'année.

Tableau 3-1 : Données météorologiques (moyennes mensuelles) relevées par la station de l'Embrapa-Hortaliças (année 1998)

Mois	Mai	Juin	Juillet	Août	Septembre	Octobre
Température (°C)	21,8	20,6	21,9	24,0	27,3	25,3
Hygrométrie (%)	72,5	64,3	45,4	46,4	38	60,5
Précipitations (mm)	28,8	28	0	0	29,9	123,1

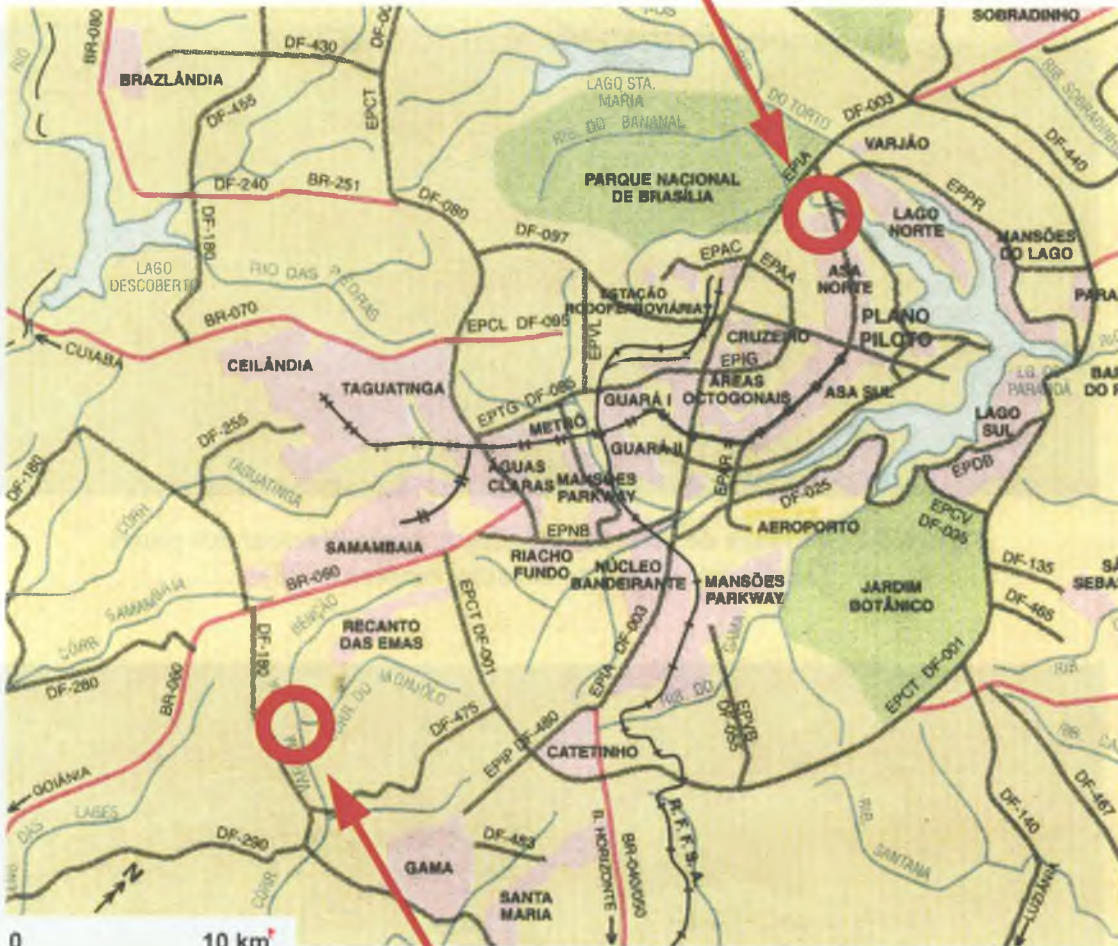
III.2.2 - La zone d'expérimentation

Deux parcelles ont été préparées à l'Embrapa-Hortaliças, dans les terrains d'expérimentation de cet institut.

La première était située à l'ouest du centre de recherches, à proximité d'une rivière dont la forêt-galerie protégeait latéralement cette parcelle (fig. 3-2). Elle était donc peu exposée au vent. La seconde parcelle était localisée à deux kilomètres à l'est de la première, en terrain plus dénudé et donc plus venté. La station météorologique automatique était localisée à mi-distance entre les deux parcelles.

Plantées à la mi-juin, ces deux parcelles resteront les seules cultures de choux de l'Embrapa-Hortaliças. Il s'agit des premières cultures de ce type de la saison et il n'en a pas existé d'autres à moins de 5 kilomètres à la ronde. *Plutella xylostella* et ses parasitoïdes doivent donc migrer naturellement sur plusieurs kilomètres à partir des réservoirs de populations qui se maintiennent durant la saison humide (Castelo-Branco, comm. pers.). Ces réservoirs consistent en des petites productions de choux à usage personnel effectuées dans les jardins des particuliers. Les insectes s'y maintiennent à un faible niveau de population à cause de l'effet lessivant des pluies qui détruisent la plupart des œufs et chenilles du papillon tout en l'empêchant de se déplacer.

Embrapa-Cenargen



Embrapa-Hortaliças

Carte 4 : Région de Brasília-DF, avec localisation des centres de recherche Embrapa-Cenargen et Embrapa-Hortaliças.

L'Embrapa-Cenargen est au nord de la ville même de Brasilia ("Plano Piloto", la grande structure en forme d'avion).

BRESIL



Figure 3.1 : Paysage de cerrados brésiliens, après le retour des pluies.
(Jardin Botanique de Brasilia, octobre 1998)



Figure 3.2a : Parcelle 1 à l'Embrapa-Hortaliças, en juillet 1998 (le centre est à l'arrière-plan)



Figure 3.2b : Parcelle 1 vue sous un autre angle, montrant la forêt-galerie protectrice
Des cultures de maïs et de carottes ont recouvert les terres nues au premier plan



Figure 3.2c : Parcelle 2 à l'Embrapa-Hortaliças, plus exposée

A la plantation de ces parcelles, nous avons donc un point "zéro" avec un nombre de papillons pratiquement nul, permettant de suivre la totalité de la dynamique des populations de *P. xylostella* à partir de son apparition dans le secteur. Les chenilles récoltées ont été nourries au début avec des feuilles de choux provenant de ces mêmes parcelles, puis par la suite avec du chou vert (non pommé) provenant d'un champ non traité à l'ouest de Brasilia.

La seconde culture s'est effectuée en repiquant des jeunes plants de choux dans les espaces laissés vacants par les échantillonnages successifs (20 choux arrachés durant 13 ou 15 semaines) ce qui a permis aux insectes de se déplacer aisément vers cette source de nourriture fraîche. L'échantillonnage des vieux choux a été alors abandonné et nous n'avons plus pris en compte que ces nouveaux plants.

Un décalage temporel s'est produit lors de la première préparation des parcelles : la parcelle 1 a été plantée deux semaines plus tôt que la parcelle 2. L'échantillonnage a également commencé deux semaines plus tôt et s'est poursuivi durant 15 semaines sur la parcelle 1, tandis qu'il n'a été poursuivi que pendant 13 semaines sur la parcelle 2. Pour la seconde culture, la replantation a été synchrone et l'échantillonnage a duré 11 semaines dans les deux cas. Les calculs et les courbes ont été effectués en prenant en compte cette distorsion, très légère étant le faible nombre d'insectes collectés au début de l'expérience. Pour certains calculs nous avons cependant ajouté deux semaines fictives dans l'échantillonnage de la parcelle 2, au début, ce qui équivaut à avoir commencé les échantillonnages en même temps sur les parcelles mais sans trouver d'insectes les deux premières semaines.

III.3.3 - Résultats et discussion

III.3.3.1 - Les ravageurs du chou

Le principal ravageur observé est *P. xylostella*. Ses populations suivent une courbe de croissance logistique durant la première culture (fig. 3-3). Les courbes sont similaires d'une parcelle à l'autre, et le test t sur séries d'effectifs appariés ne montre aucune différence significative pour le nombre d'individus récoltés sur les parcelles. Les deux populations ont donc évolué de même manière, soumises aux mêmes influences.

	Parcelle 1	Parcelle 2	t calculé (ddl = 14)
Nombre moyen de <i>P. xylostella</i> récoltées	611,3	505,2	2,12 - NS

Dans cette première culture, une phase de croissance exponentielle est observée de la deuxième à la neuvième semaine en parcelle 1, où la population de *P. xylostella* est passée de 0 à 2 200 individus échantillonnés environ, et de la quatrième à la onzième semaine pour la parcelle 2, où la population passe de 20 à 1 850 individus (fig. 3-4). L'obtention de ces

valeurs nécessite un doublement hebdomadaire du nombre d'individus récoltés. Puis la croissance ralentit pour atteindre un plateau en fin de première culture, vers la treizième semaine.

Durant la seconde culture de choux, les populations de *P. xylostella* resteront toujours très réduites, ne dépassant jamais 15 individus par échantillonnage de 20 choux prélevés.

Une hypothèse peut être avancée pour expliquer cette forme de croissance : au début de la saison sèche, *P. xylostella* dispose d'un grand nombre de plantes-hôtes de bonne qualité, où les parasitoïdes ne sont pas encore apparus. Il n'y a donc aucune restriction à la croissance du ravageur et celui-ci se multiplie au maximum de ses capacités de développement. Après cette phase de six semaines, la qualité de la nourriture commence à diminuer. La majorité du feuillage des choux a été consommée et les choux vieillissent, produisant de nouvelles feuilles plus coriaces et moins appétantes. De plus les parasitoïdes sont apparus et se développent, perturbant les populations de chenilles. La courbe d'évolution de *P. xylostella* amorce alors une inflexion qui conduit à une stabilisation en septembre, due à l'apparition des pommes dans les choux, que les chenilles apprécient peu. En parallèle, le taux de parasitisme atteint des valeurs élevées, supérieures à 50 % (tableau 3-2). Tous ces facteurs font chuter la population de *P. xylostella* à un niveau bas qui le restera jusqu'au retour des pluies, début novembre. Les précipitations deviennent alors le principal facteur limitant des populations du ravageur, par leur action lessivante qui décroche les œufs, noie les chenilles et gêne le déplacement des adultes (Wakisaka *et al.*, 1992).

On peut distinguer des oscillations dans la courbe d'évolution des populations. Elles sont probablement dues à l'existence de générations "discrètes" du papillon, c'est-à-dire distinctes temporellement. Les populations dérivant de quelques individus migrants, la plupart des individus qui en sont issus ont un développement synchrone et passent par les mêmes stades au même moment. Pour la parcelle 1, il y a ainsi nymphose de la première génération à la cinquième semaine. Les imagos émergent quelques jours après et commencent à pondre, puis meurent. Il y a donc plus d'œufs et de jeunes chenilles et moins de nymphes et de chenilles âgées au cours des semaines suivantes ; or l'échantillonnage ne prend pas en compte les très jeunes stades. On peut donc s'attendre à une stabilisation, voire une réduction du nombre d'individus récoltés et c'est effectivement ce qui se passe en sixième et septième semaine. Le raisonnement peut s'appliquer tout au long de la courbe et on distingue ainsi une génération du papillon toutes les quatre semaines environ. Avec des températures moyennes oscillant entre 20 et 24 °C selon le mois, ces résultats rejoignent ceux d'autres études (Hardy, 1938 ; Salinas, 1986b). Pour la seconde culture de choux, le nombre d'individus récoltés est trop faible pour en tirer toute déduction. Comme les températures restent comprises dans une gamme de 20 à 25 °C toute l'année (NOAA, 1998),

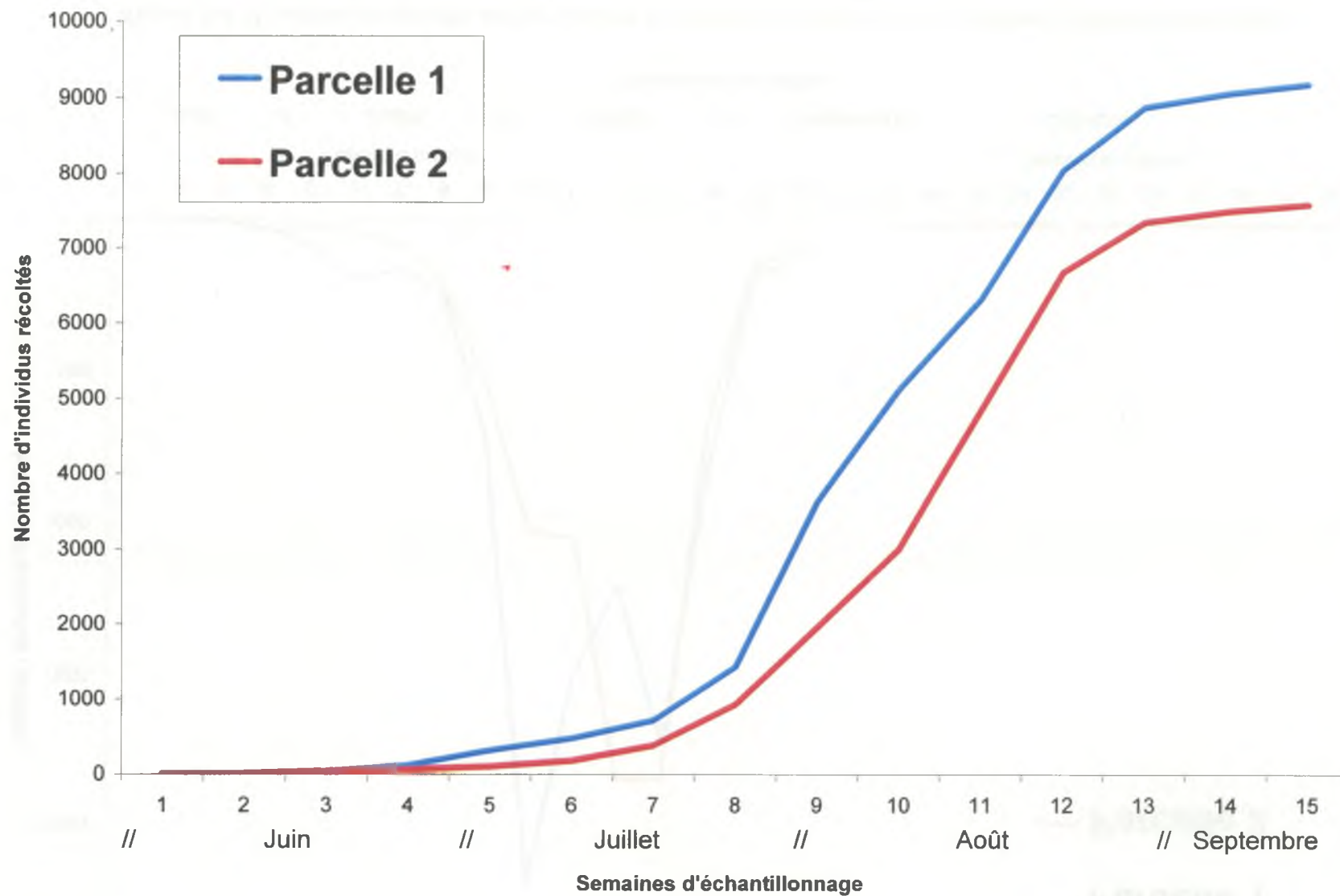


Figure 3-3 : Courbe cumulée des populations de *Plutella xylostella* pendant la première culture sur les parcelles de l'Embrapa-Hortaliças.

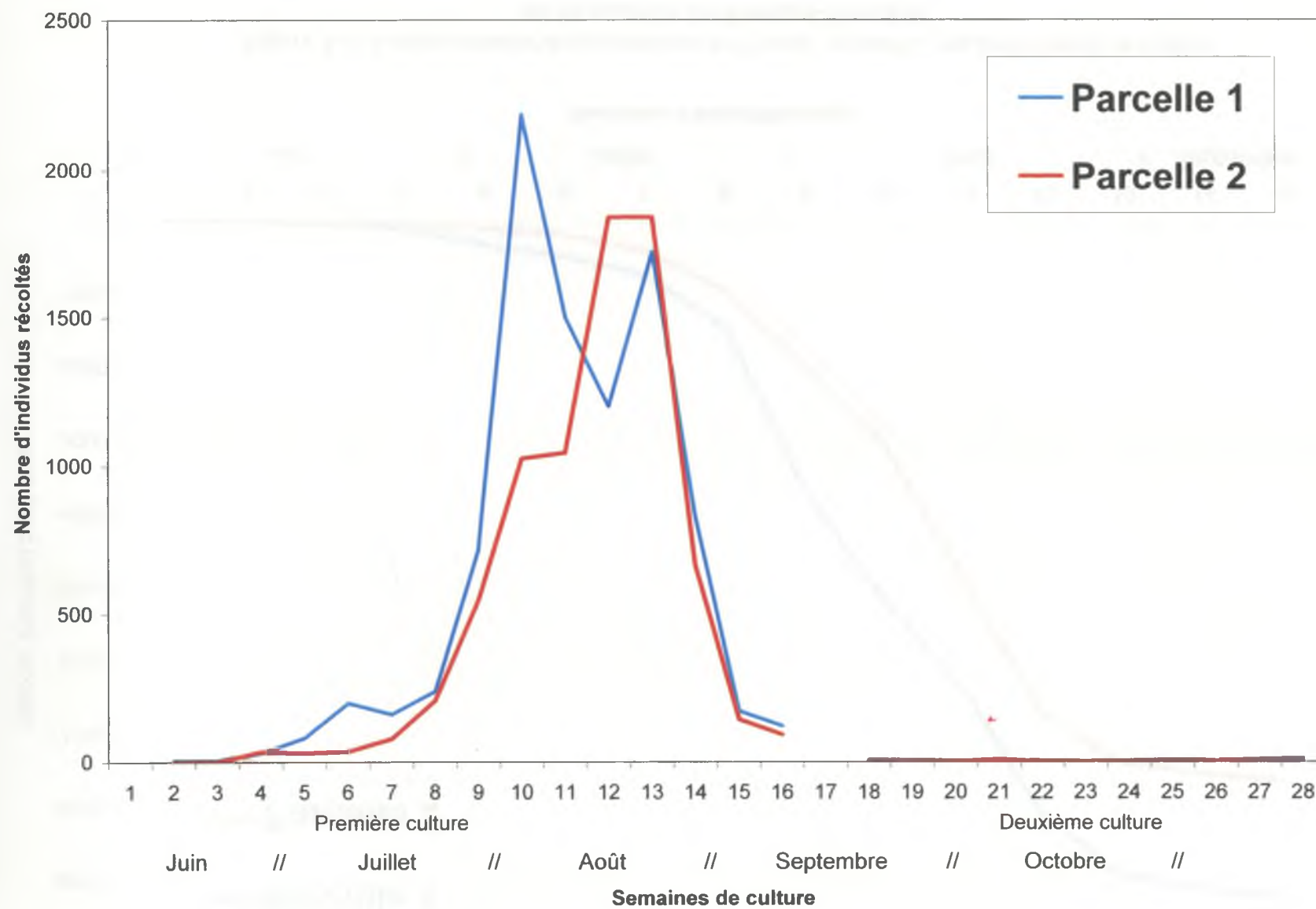


Figure 3-4 : Evolution temporelle des populations de *Plutella xylostella* sur les parcelles de l'Embrapa-Hortaliças

Tableau 3-2 : Taux de parasitisme hebdomadaires dans les populations de *Plutella xylostella* échantillonnées à l'Embrapa-Hortaliças

Parcelle 1

Semaine	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Nombre de chenilles et de nymphes récoltées	4	4	30	81	198	160	238	716	2 189	1 501	1 201	1 723	831	172	122
Taux de parasitisme (%)	25	0	3,0	0	3	7,0	2,1	1,8	2,9	12,0	12,8	23,4	50,5	65,8	46,5

Parcelle 2

Semaine	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Nombre de chenilles et de nymphes récoltées	-	-	34	30	35	77	207	545	1 025	1 044	1 839	1 841	665	144	92
Taux de parasitisme (%)	-	-	5,9	16,7	11,4	3,9	15,0	1,5	4,2	3,8	7,4	23,6	46,5	68,7	50,6

l'existence d'une douzaine de générations annuelles est théoriquement possible mais on ne peut vraiment parler de générations bien définies étant donné le très faible niveau de population présent durant la saison des pluies.

Quelques autres prédateurs ont été observés durant l'étude. Des pucerons appartenant probablement à l'espèce *Brevicoryne brassicae* L. (Homoptera : Aphidae) ont pullulé temporairement. Des chenilles de *Spodoptera frugiperda* (F.) et de *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lep. : Noctuidae) ont été occasionnellement observées. Nous avons également observé *Hellula undalis* (F.) (Lep. : Pyralidae), dont les chenilles forent les tiges et le méristème central des jeunes choux, déformant les plants qui développent alors leurs bourgeons axillaires, formant un grand nombre de petites pommes invendables. Dans la seconde culture, de nombreux plants ont ainsi été abîmés (de l'ordre de 40 %), même si la chenille en cause était déjà partie attaquer un autre pied. Aucun parasitoïde n'a été récolté sur les chenilles de ces ravageurs secondaires.

III.3.3.2 - Les ennemis naturels du ravageur

Sept espèces de parasitoïdes ont été observées au cours de l'étude (tableau 3-3). La plupart sont des endoparasitoïdes larvaires, à l'exception de *Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov) (Hym. : Eulophidae) qui est un endoparasitoïde larvo-nymphal et des *Conura* qui sont des parasitoïdes nymphaux. Le développement de leurs populations était encore plus brusque que celui de *P. xylostella* car le nombre de parasitoïdes échantillonnés était pratiquement nul jusqu'à la septième semaine alors que les populations de *P. xylostella* se développaient progressivement dès la première semaine.

L'espèce la plus communément trouvée a été *Diadegma leontinae* Brethes (Hym. : Ichneumonidae). C'est l'espèce généralement observée sur les chenilles de *P. xylostella* dans tout le continent sud-américain (Delvare, comm. pers.). Sa sex-ratio est de 1,11 (rapport mâles : femelles ; n = 1 916 individus).

La seconde espèce par ordre d'importance appartient au genre *Apanteles*. Il s'agit de *Apanteles piceotrichosus* (Blanchard) (Hym. : Braconidae), qui a déjà été observé dans le sud du Brésil, à Aguas Claras, dans l'état du Rio Grande do Sul (Ferronato & Becker, 1984). Cependant la nature des hyperparasites trouvés dans les cocons de cet *Apanteles* sp. suggère plutôt l'appartenance de celui-ci à un genre très proche, *Dolichogeneidea* (Delvare, comm. pers.). Sa sex-ratio est de 0,96 (n = 317 individus).

La troisième espèce en importance est *Oomyzus* (= *Tetrastichus*) *sokolowskii* (Hym. : Eulophidae). Elle avait déjà été signalée (pour la première fois en Amérique du Sud) dans cette même étude de Ferronato & Becker (1984). Une moyenne de 8,3 individus émergent des nymphes parasitées (n = 301 nymphes observées), alors que

Adultes

Nymphes et cocons

Plutella xylostella (femelle)

Diadegma leontiniae (femelle)
(solitaire)

Apanteles piceotrichosus
(femelle) (solitaire)

Oomyzus sokolowskii
(grégaire)



5 mm

Figure 3-5 : *Plutella xylostella* et ses principaux parasitoïdes rencontrés à l'Embrapa-Hortaliças

Ferronato & Becker observaient des valeurs de 5 à 7 individus par nymphe en fonction de leur échantillonnage.

Ces trois espèces (fig. 3-5) représentent 99 % des effectifs des parasitoïdes de ces populations de *P. xylostella*. *Cotesia plutellae* n'était représenté que par une douzaine de spécimens, bien que cette espèce ait été beaucoup plus abondante au cours des années précédentes (Barbosa & França, 1981 ; Monnerat, 1995). Cette population de *C. plutellae* semble présenter des différences morphologiques par rapport au type (ovipositeur plus court, genitalia mâles différentes) (Polaszek, comm. pers.).

Seuls huit spécimens de la tachinaire du genre *Actia* ont été récoltés, alors qu'elle était également plus abondante au cours des années précédentes, surtout en fin de saison sèche (Castelo-Branco, comm. pers.). Quant aux *Conura*, si seuls onze spécimens ont été collectés à partir de nymphes de *P. xylostella*, il s'agit en fait d'hyperparasites occasionnellement parasitoïdes primaires. Signalons que les *Conura* ont été récemment placés dans ce genre, étant antérieurement classés dans le genre *Spilochalcis* (Delvare, comm. pers.). *Conura pseudofulvovariegata* (Becker) (Hym. : Chalcididae) est une espèce récemment découverte au Brésil (Becker, 1989), mais abondante tant comme parasitoïde primaire que secondaire (= hyperparasite). A l'inverse, un seul spécimen de *Conura* affine *unimaculata* a été collecté, à partir d'une nymphe de *P. xylostella*.

Tableau 3-3 : Parasitoïdes observés sur les populations de *Plutella xylostella* au Brésil

Genre	espèce	Auteur	Ordre	Famille	(%)
<i>Diadegma</i>	<i>leontinae</i>	Brethes	Hym.	Ichneumonidae	64,6
<i>Apanteles</i>	<i>piceotrichosus</i>	Blanchard	Hym.	Braconidae	20,6
<i>Oomyzus</i>	<i>sokolowskii</i>	(Kurdjumov)	Hym.	Eulophidae	13,9
<i>Cotesia</i>	<i>plutellae</i>	(Kurdjumov)	Hym.	Braconidae	0,36
<i>Conura</i> (= <i>Spilochalcis</i>)	<i>pseudofulvovariegata</i>	(Becker)	Hym.	Chalcididae	0,30
<i>Actia</i>	sp.		Dipt.	Tachinidae	0,24
<i>Conura</i> (= <i>Spilochalcis</i>)	affine <i>unimaculata</i>	(Ashmead)	Hym.	Chalcididae	0,03

(%) : proportion de chaque espèce dans le parasitisme total constaté.

Par ailleurs des guêpes non identifiées (probablement des Eumenidae) ont été observées en train d'inspecter les choux, mais elles n'ont pas été aperçues transportant

de proie et il est impossible de préciser si elles attaquent les chenilles de *P. xylostella* ou si elles recherchaient l'eau accumulée après les arrosages ou le miellat des pucerons. Des guêpes prédatrices de *P. xylostella* ont cependant déjà été observées lors d'autres études (Cordero & Cave, 1992). Il faut signaler aussi que des parasitoïdes ont été observés de manière plus précoce à Brasília même, fin mai, sur une petite parcelle de démonstration. *Diadegma leontinae*, *C. plutellae* et *O. sokolowskii* étaient présents, ainsi que les deux ravageurs *Ascia monuste* L. (Lep. : Pieridae) et *Diabrotica* sp. (Col. : Chrysomelidae), ces derniers n'ayant pas été retrouvés dans les parcelles de l'Embrapa-Hortaliças.

L'analyse des préférences alimentaires des parasitoïdes (choix du stade de la chenille) n'a été possible que sur les deux espèces de parasitoïdes les plus abondantes, à savoir *D. leontinae* et *A. piceotrichosus*, car le modèle log-linéaire utilisé n'est utilisable que s'il n'y a aucune valeur nulle (E. Gozé, comm. pers.). Il est donc nécessaire d'éliminer des tableaux de données toutes les semaines où il y avait absence de ces espèces de parasitoïdes et de concentrer les calculs sur les valeurs des semaines restantes, soit huit semaines (sur 28, pour les deux parcelles) pour *D. leontinae* (ces semaines regroupant plus de 90 % des spécimens collectés) et cinq semaines seulement pour *A. piceotrichosus* (mais elles regroupent plus de 85 % du nombre total de spécimens collectés).

Pour *D. leontinae*, on observe une augmentation significative du taux de parasitisme en fonction de l'âge des chenilles : le stade L3 est significativement plus parasité que le stade L2 ($P < 0,0001$), et le stade L4 significativement plus que le L3 ($p < 0,0001$) (tableau 3-4). Toutefois, cette augmentation du taux de parasitisme avec le stade n'est pas la preuve d'une préférence de *Diadegma* pour les stades les plus avancés. En effet, même en l'absence de préférence alimentaire le temps d'exposition des chenilles aux parasitoïdes est plus grand pour les stades avancés que pour les stades précoces. Par conséquent, à moins d'une mortalité rapide des individus parasités une augmentation du taux de parasitisme avec l'âge ne signifie pas une préférence pour un stade ou un autre. On a là un parasitoïde probablement peu ou pas spécifique d'un stade particulier de *P. xylostella*.

Au contraire, chez *A. piceotrichosus*, le modèle montre l'absence d'augmentation du taux de parasitisme avec le stade et même une diminution significative ($p < 0,0001$) (tableau 3-5). Ceci signifie que *A. piceotrichosus* pourrait posséder des préférences de stade larvaire strictes : il ne s'attaquerait qu'au stade L2 et pas aux suivants. D'où l'observation d'un taux de parasitisme n'augmentant pas sur les chenilles collectées en

Tableau 3-4 : Préférences alimentaires de *Diadegma leontinae* sur les stades L2 à L4 des chenilles de *Plutella xylostella* au Brésil

Stade larvaire	d.d.l	Cote	Erreur-type	χ^2	Probabilité
L2	1	- 1,08	0,12	85,2	0,0001
L3	1	- 0,42	0,097	18,4	0,0001
L4	0	0	0	-	-

Tableau 3-5 : Préférences alimentaires d'*Apanteles piceotrichosus* sur les stades L2 à L4 des chenilles de *Plutella xylostella* au Brésil

Stade larvaire	d.d.l	Estimation	Erreur-type	χ^2	Probabilité
L2	1	1,50	0,18	71,0	0,0001
L3	1	1,29	0,18	53,7	0,0001
L4	0	0	0	-	-

Tableau 3-6 : Détail d'une semaine d'échantillonnage (douzième semaine, parcelle 2). Taux de parasitisme par *Apanteles piceotrichosus* pour chaque stade larvaire

Stade larvaire	L2	L3	L4	Ensemble de l'échantillon
Nombre d' <i>Apanteles</i> sp. collectés	70	53	29	152
Taux de parasitisme observé (%)	6,4	4,8	2,6	13,8

L3 ou L4 puisqu'elles ne sont plus attaquées. Certes, c'est en fait une diminution qui est observée ici mais une diminution réelle est peu probable car il faudrait envisager un mécanisme entraînant une mortalité ciblée et rapide des chenilles déjà parasitées. Nous pouvons cependant interpréter le phénomène de la façon suivante, en prenant comme exemple les prélèvements de la parcelle 2 au cours de la douzième semaine, qui représente bien cette situation (tableau 3-6). La douzième semaine se situe en plein pic de croissance de la population du ravageur *P. xylostella* et aussi de son parasitoïde *Apanteles piceotrichosus*, inexistant jusqu'à la neuvième semaine. Lorsque l'on collecte simultanément des chenilles des stades L2, L3 et L4, en sachant que *A. piceotrichosus* n'attaque que le stade L2, on a en fait un instantané de la situation : les chenilles de stade L2 viennent d'être parasitées (depuis quelques heures à 2-3 jours maximum) à un moment où les *Apanteles* deviennent nombreux. Les chenilles des stades L3 et L4 ont pour leur part été attaquées plusieurs jours auparavant ; or la population d'*Apanteles* n'a explosé qu'entre la onzième et la douzième semaine : il est donc logique que le taux de parasitisme des chenilles L3 et surtout L4 soit beaucoup plus faible que celui observé chez les chenilles L2, nouvellement attaquées. Le taux de parasitisme des stades L3 et L4 reflète donc une situation où la population d'*Apanteles* était plus faible, ce qui crée ce paradoxe d'une diminution apparente du taux de parasitisme au cours du temps. La semaine suivante on observe un taux de parasitisme maximal sur le stade L3, explicable par le fait que les chenilles L3 de la treizième semaine étaient au stade L2 la semaine précédente, alors que les populations d'*Apanteles* avaient fortement augmenté puis s'étaient stabilisées rapidement. En extrapolant on pourrait alors en déduire que lors de la semaine suivante le taux de parasitisme aurait culminé pour le stade L4 ; malheureusement les données de cette semaine n'ont pu être intégrées à l'analyse car trop peu d'*Apanteles* ont été collectés, leur période d'abondance ayant été très courte. Comme les cinq semaines utilisées lors de l'analyse sont toutes situées dans la phase d'évolution ascendante des populations d'*Apanteles*, le paradoxe évoqué précédemment se retrouve dans le résultat final de l'analyse.

Curieusement les parasitoïdes ne se sont pas développés de la même façon sur les deux parcelles (fig. 3-6). *Diadegma leontinae* a été prédominant sur la parcelle 1, d'où *A. piceotrichosus* était quasiment absent. Par contre les deux espèces étaient à égalité numérique sur la parcelle 2. Pour leur part, les effectifs d'*O. sokolowskii* ont présenté la même évolution d'une parcelle à l'autre. Le test t confirme la différence significative du nombre de *D. leontinae* entre les parcelles, et l'absence de différence pour *O. sokolowskii*. Par contre il n'y avait pas de différence entre les effectifs d'*Apanteles* des deux parcelles, pourtant fort dissemblables (80 et 660 individus récoltés respectivement dans la parcelle 1 et dans la parcelle 2) : le test est juste au-dessous de

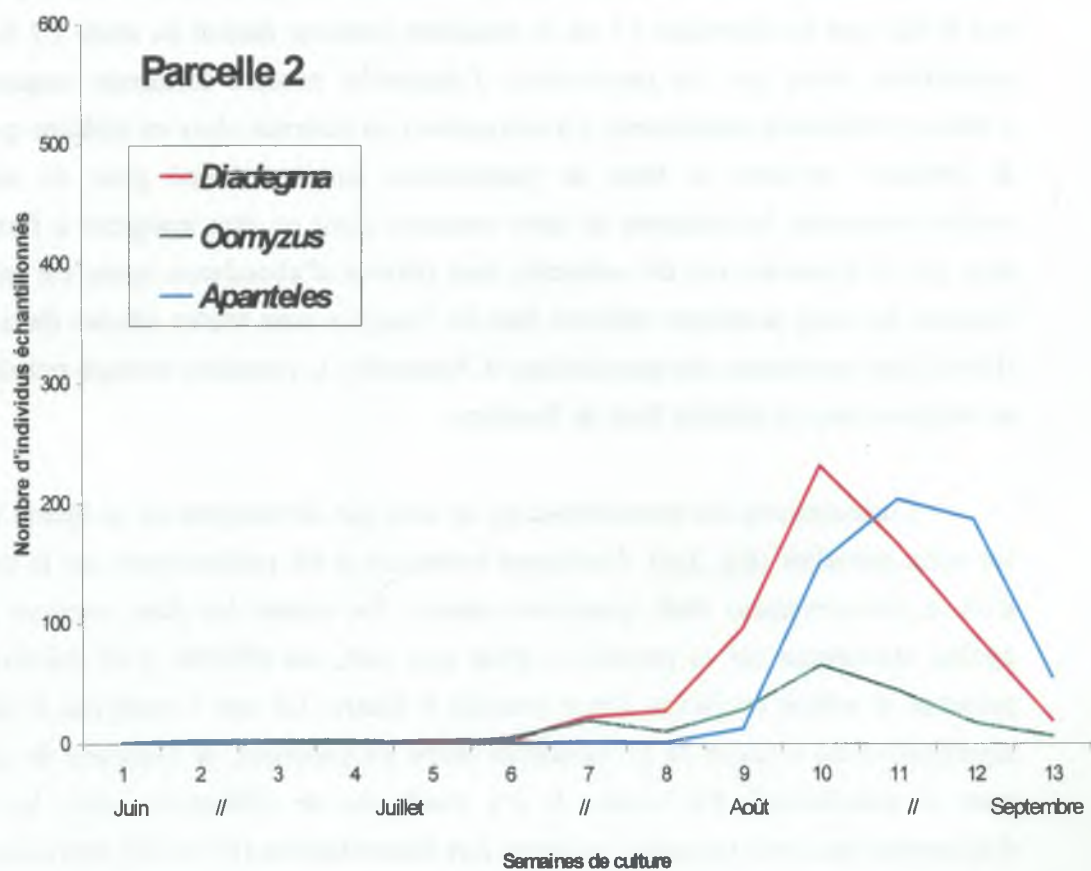
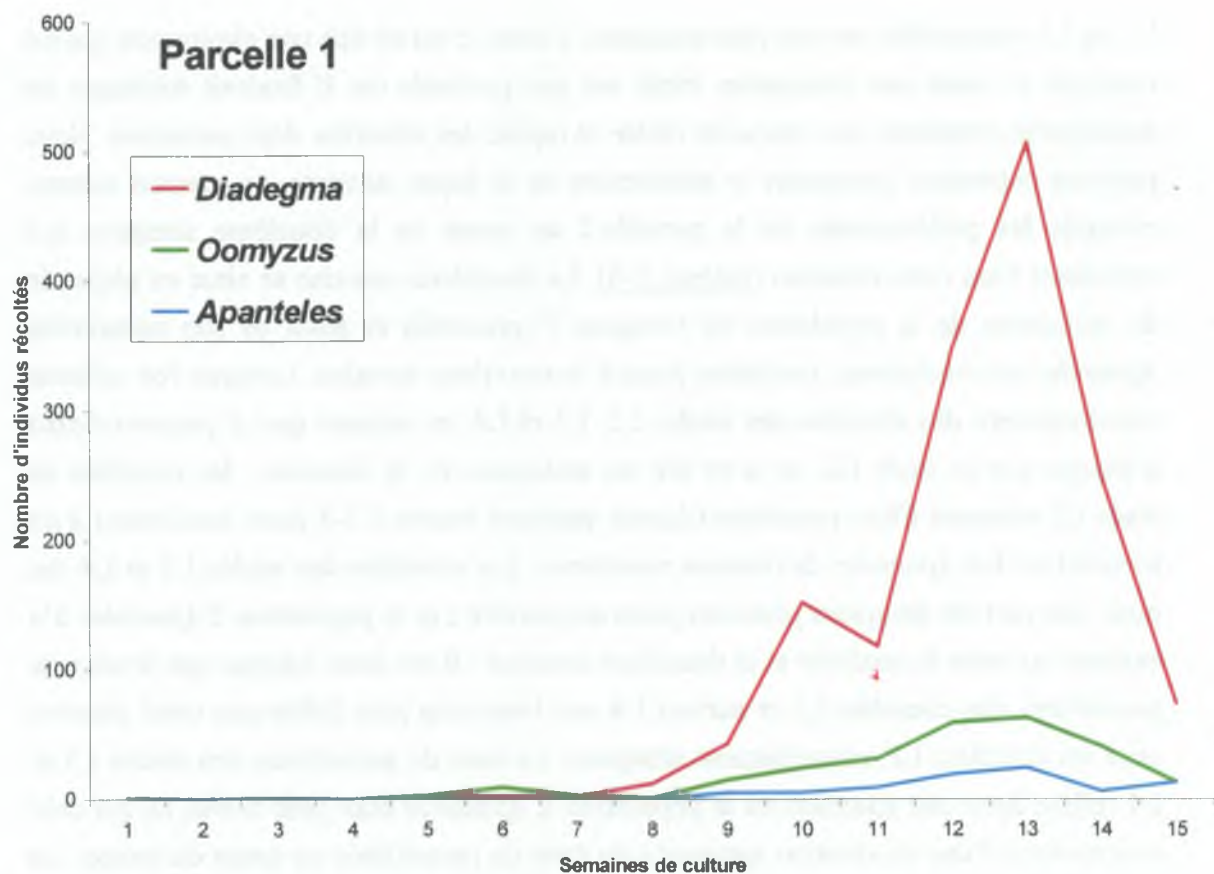


Figure 3-6 : Répartition temporelle des principaux parasitoïdes échantillonnés sur les parcelles de l'Embrapa-Hortaliças (Brésil)

la limite de significativité à 5 % (tableau 3-7). Ceci peut s'expliquer par la présence d'un léger décalage temporel entre l'évolution des populations entre les deux parcelles (*A. piceotrichosus* est un peu plus tardif en parcelle 2), que le test t ne prend pas en compte (E. Gozé, comm. pers.). L'absence de différence concernant *O. sokolowskii* pourrait être liée à son comportement densité-indépendant : cette espèce à développement plus lent que *D. leontinae* et *A. piceotrichosus* ne suit pas rapidement les fluctuations des populations de son hôte et est resté à un bas niveau dans les deux cas.

Tableau 3-7 : Nombre moyen de parasitoïdes observés sur *Plutella xylostella* dans les échantillonnages hebdomadaires de choux sur les parcelles de l'Embrapa-Hortaliças (Brésil)

Parasitoïdes	Parcelle 1	Parcelle 2	t calculé (ddl = 14)
<i>Diadegma</i>	100,8	44,1	2,87 - $p < 0,05$
<i>Oomyzus</i>	17,6	13,7	1,39 - NS
<i>Apanteles</i>	5,4	40,7	2,03 - NS ($p < 0,07$)
Tous les parasitoïdes	123,8	98,5	1,87 - NS

S'il y a des différences significatives dans les taux *spécifiques* de parasitisme (c'est-à-dire les taux de parasitisme provoqués par chaque espèce prise séparément), le taux moyen de parasitisme (c'est-à-dire le parasitisme de toutes les espèces additionnées) est identique sur les deux parcelles (respectivement 24 % et 22 % sur les parcelles 1 et 2). L'action conjuguée des parasitoïdes est donc la même sur les deux parcelles, au demeurant très insuffisante pour réguler la croissance de *P. xylostella* et l'empêcher de provoquer des dégâts.

Les différences de proportion de *Diadegma* et *Apanteles* entre les parcelles s'expliquent difficilement : celles-ci ne sont distantes que de deux kilomètres, visibles l'une de l'autre, sans obstacles entre elles et soumises aux mêmes conditions climatiques. Les températures relevées y sont similaires, y compris l'amplitude thermique ; les courbes hygrométriques diffèrent peu, avec un minimum de 50 % en parcelle 1 et 40 % en parcelle 2.

La différence objective entre les parcelles est leur exposition au vent, la parcelle 2 étant la plus exposée. Bien que la vitesse du vent n'ait pu être mesurée au niveau de chaque parcelle, la station météo centrale indiquait régulièrement des vents de vitesse moyenne 1-2 m.s⁻¹ dans la journée et la parcelle 2 subissait plus fortement leur

influence de par sa position exposée. Ces vents ont pu gêner *Diadegma*, meilleur voilier et peut-être plus facilement emporté hors des parcelles et donc éloigné de son hôte ; il semble ainsi avoir eu plus de mal à s'implanter dans la parcelle 2, laissant l'avantage à *Apanteles* qui a pu s'imposer à égalité dans ce cas alors qu'il était supplanté en parcelle 1. *Oomyzus sokolowskii*, volant très peu et à action densité-indépendante, n'a semble-t-il pas été influencé par ce facteur.

La raréfaction de *C. plutellae* par rapport aux observations effectuées au cours des années antérieures n'est pas non plus expliquée : peut-être souffre-t-il d'une compétition avec *A. piceotrichosus* et surtout *D. leontinae*, ce qui expliquerait pourquoi les quelques spécimens observés l'ont été surtout en début de saison de culture, avant que les autres espèces ne se développent. La tachinaire *Actia* sp. pourrait avoir subi le même sort.

III.3.3.3 - Les hyperparasites

Sept espèces d'hyperparasites ont été collectées à partir des cocons de *Diadegma leontinae* et d'*Apanteles piceotrichosus* (tableau 3-8). *Basileucus* sp. (Hym. : Ichneumonidae) et *Haltichella* sp. (Hym. : Chalcididae) n'ont été représentés que par des mâles (3 et 5 respectivement) et ne sont donc pas identifiables au niveau spécifique. Une unique attaque de *Trichospilus diatreae* (Cherian & Margabandha) (Hym. : Eulophidae) a été observée, correspondant à une dizaine de spécimens collectés car c'est un parasitoïde grégaire.

Si ces parasitoïdes appartiennent à de multiples espèces, ils sont globalement peu abondants puisque le taux d'hyperparasitisme observé a été de 3,3 % sur les cocons de *Diadegma* et de 3,4 % sur ceux d'*Apanteles* (total des cocons observés : respectivement 2 250 et 704 pour *Diadegma* et *Apanteles*).

Apanteles piceotrichosus est attaqué par trois espèces d'hyperparasites, dans l'ordre d'abondance *Haltichella* sp., suivi de *Trichomalopsis oryzae* Risbec (Hym. : Pteromalidae) puis de *Conura pseudofulvovariegata* (Becker).

Diadegma leontinae a été attaqué par les sept espèces observées. Dans l'ordre d'importance nous trouvons : *Conura pseudofulvovariegata*, *Aphagnomus fijiensis* (Ferrière) (Hym. : Ceraphronidae), *Haltichella* sp. et quatre autres espèces comptant pour moins de 5 % chacune : *Basileucus* sp., *Brachymeria annulata* (F.) (Hym. : Chalcididae), *T. oryzae* et *Trichospilus diatreae*. Les trois espèces attaquant *Apanteles* sont également présentes sur les cocons de *Diadegma* mais pas dans le même ordre d'importance puisque *C. pseudofulvovariegata*, minoritaire sur *Apanteles*, est l'espèce majoritaire sur *Diadegma*. La proportion de *Haltichella* sp. est rigoureusement opposée sur ces deux parasitoïdes. Ces hyperparasites sont peu spécifiques puisqu'ils attaquent sans problème deux parasitoïdes de familles différentes. Notons que comme seuls les

mâles de *Haltichella* sp. ont été observés, il est possible que les femelles attaquent un autre hôte non repéré ici (Delvare, comm. pers.). *Trichospilus diatreae* est habituellement un parasitoïde de diverses espèces de Noctuidae, occasionnellement présent sur *P. xylostella* à la Jamaïque (Alam, 1992) mais il s'avère être ici un hyperparasite de *Diadegma*.

On rencontre donc un cortège parasitaire d'une grande diversité, s'approchant de celle rencontrée dans les régions à climat méditerranéen d'où l'on suppose *P. xylostella* originaire et où une longue coévolution a pu se développer (Hardy, 1938 ; Mustata, 1992). Or Brasilia est une ville récente (inaugurée en 1960) et pourtant, en moins de 40 années, ont pu s'installer *P. xylostella* et 12 parasitoïdes primaires et secondaires. Les grandes capacités migratoires de *P. xylostella* expliquent facilement son arrivée, mais c'est plus difficile pour les parasitoïdes, d'autant plus qu'il n'y a eu pas d'introductions volontaires reportées dans la littérature concernant ces espèces, excepté pour *Cotesia plutellae*, introduit en 1972 au Brésil, avec un résultat inconnu (Cock, 1985).

Tout comme les parasitoïdes n'ont pu réguler les populations de leur hôte à cause d'un taux de parasitisme insuffisant, les hyperparasites ont quant à eux exercé de la même façon un effet négligeable sur les populations d'*Apanteles* et de *Diadegma* du Brésil, qui se sont rapidement développées à la fin de la première culture à la suite de celles de *P. xylostella*.

Tableau 3-8 : Hyperparasites présents sur les deux principaux parasitoïdes de *Plutella xylostella* (Brésil)

Hôte	Genre	Espèce	Auteur	Famille	(%)
<i>Apanteles</i>	<i>Haltichella</i>	sp.		Chalcididae	60,9
	<i>Trichomalopsis</i>	<i>oryzae</i>	(Risbec)	Pteromalidae	26,1
	<i>Conura (Spilochalcis)</i>	<i>pseudofulvovariegata</i>	(Becker)	Chalcididae	13,0
<i>Diadegma</i>	<i>Conura (Spilochalcis)</i>	<i>pseudofulvovariegata</i>	(Becker)	Chalcididae	58,4
	<i>Aphagnomus</i>	<i>fijiensis</i>	(Ferrière)	Ceraphronidae	23,4
	<i>Haltichella</i>	sp.		Chalcididae	6,5
	<i>Basileucus</i>	sp.		Ichneumonidae	3,9
	<i>Brachymeria</i>	<i>annulata</i>	Fabricius	Chalcididae	3,9
	<i>Trichomalopsis</i>	<i>oryzae</i>	(Risbec)	Pteromalidae	2,6
	<i>Trichospilus</i>	<i>diatreae</i>	(Cherian & Margabandha)	Eulophidae	1,3

(%) : proportion de chaque hyperparasite dans le taux global d'hyperparasitisme constaté sur chaque parasitoïde

III.4 - Ile de la Réunion

III.4.1 - Introduction

La seconde partie de notre travail s'est effectuée dans la région de Saint-Pierre, au sud de l'île, dans la zone maraîchère la plus importante. Le travail de terrain s'est déroulé sur quatre mois, de mi-juillet à mi-novembre 1999, permettant le suivi complet d'une culture de choux durant une partie de l'hiver austral.

Trois parcelles ont été suivies, sur les sites suivants (**carte 5**) :

- Parcelle de "Bassin Plat", sur la station Cirad du même nom. Située à 150 m d'altitude, en dehors de la zone maraîchère, cette parcelle a été intégrée tardivement aux expérimentations et n'a pu être échantillonnée que d'octobre à mi-novembre.

Les deux autres parcelles (**fig. 3-7**), Bras de Pontho (altitude : 650 m) et Piton Hyacinthe (altitude : 1 150 m) ont été installées chez des producteurs locaux et cultivées par leurs soins en l'absence de tout traitement phytosanitaire.

Les expériences menées au Brésil se déroulaient dans une région de relief et de climat assez homogènes, le grand et ancien plateau brésilien n'offrant pas de brusques variations topographiques dans la région de Brasilia. Les parcelles d'étude n'étaient donc soumises qu'à des variations microclimatiques, engendrant pourtant des différences importantes de la répartition des parasitoïdes entre les parcelles.

L'île volcanique de la Réunion, dont le plus haut sommet culmine à 3 070 m, offre une bien plus grande diversité climatique : il existe à la fois un gradient altitudinal, s'étendant de la végétation côtière à un étage "nival" pratiquement sans plantes et un gradient est-ouest en fonction de l'exposition aux alizés et aux précipitations qu'ils amènent (ce gradient est très important, l'île cumulant de nombreux records mondiaux en matière de maximales pluviométriques). Les trois parcelles, bien que distantes de moins de 20 km les unes des autres, étaient ainsi soumises à des conditions bien différentes :

- Bassin Plat, à 150 m d'altitude, subit une température moyenne annuelle de 20 °C avec des maximales de 25 °C et des minimales d'environ 15 °C. Elle se situe dans une zone assez "sèche" de l'île, avec guère plus de 800 mm de précipitations. Les températures y sont normalement trop élevées pour la culture du chou, qui n'est développée qu'à des altitudes supérieures.

- Bras de Pontho, à 650 m d'altitude, est soumise à une température moyenne de 15 °C, des maximales de 22 °C et des minimales de 12 °C. Les précipitations atteignent près de 1 500 mm.

- Piton Hyacinthe, à 1 150 m, est situé dans une zone plus fraîche avec une température moyenne de 10 °C. L'amplitude thermique augmente avec l'altitude puisque

les maximales restent de 19°C, les minimales sont de l'ordre de 7-8 °C avec parfois des gelées blanches. Les précipitations moyennes annuelles dépassent les 1 500 mm. Les cultures maraîchères sont nombreuses à cette altitude et cette parcelle était d'ailleurs le prolongement d'un champ de choux, séparé de ce dernier par une zone tampon de 2 m de largeur plantée en betteraves. Le champ en question, par contre, était fortement traité comme le sont toutes les cultures de choux de la Réunion, ce qui provoque actuellement des problèmes de résistance.

Globalement on a donc une forte décroissance de la température moyenne, avec un gradient de -1 °C/100 m, mais les maximales ne décroissent en fait que d'un facteur moitié moindre et il fait chaud au moins une partie de la journée même en altitude : l'amplitude thermique va donc en s'accroissant. Notons finalement qu'il s'agit de moyennes annuelles et qu'à la période de l'hiver austral où se sont déroulées ces expérimentations, les valeurs effectivement constatées sont un peu plus faibles (tableau 3-9). Il pleut aussi moins à cette période, obligeant à des arrosages réguliers, mais on n'a pas le fort contraste saisonnier rencontré à Brasilia.

Tableau 3-9 : données météorologiques (moyennes mensuelles) relevées par les stations des parcelles à la Réunion (année 1999)

Température moyenne

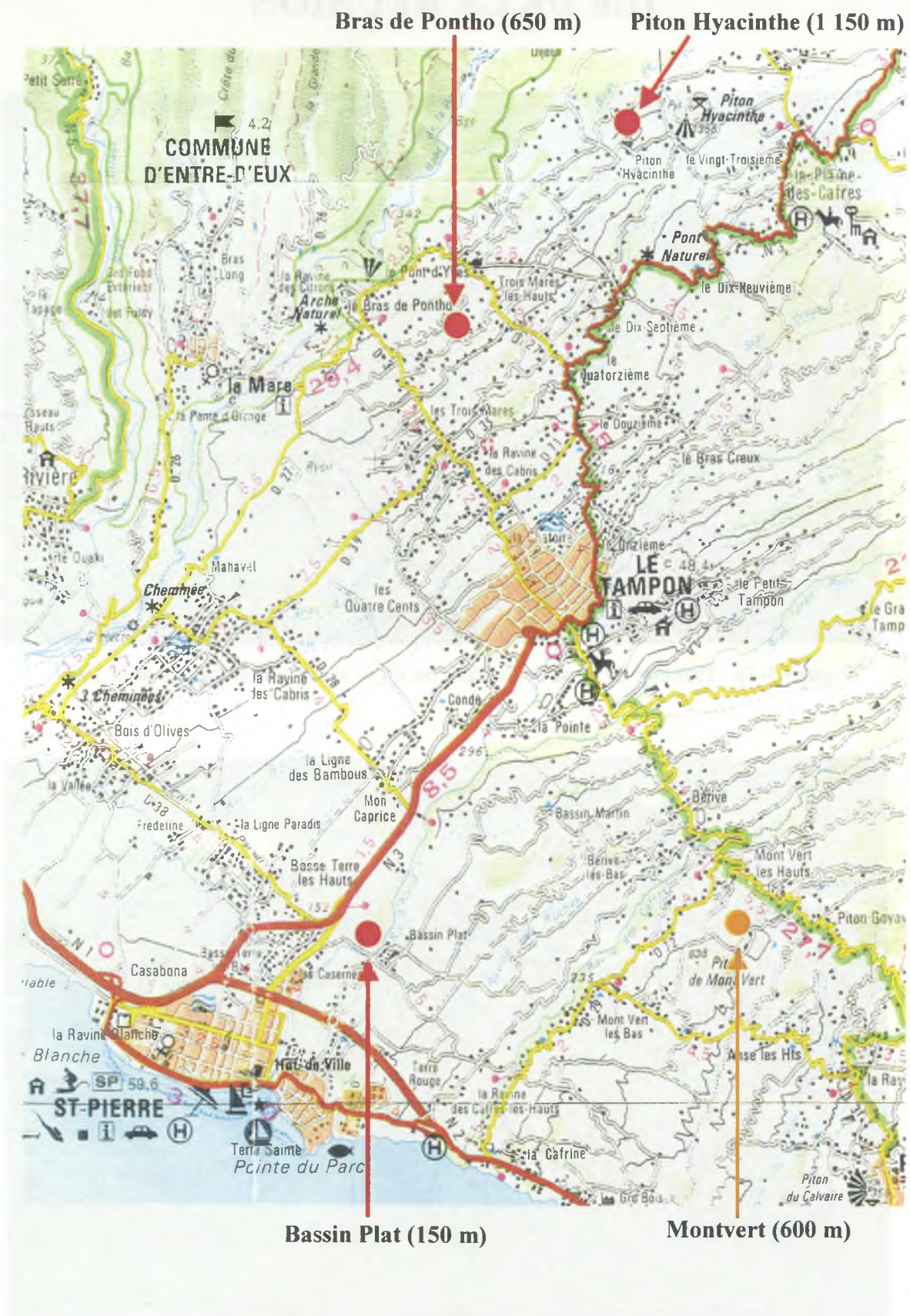
Mois	Juillet	Août	Septembre	Octobre	Novembre
Bassin Plat	19,2	19,7	20,3	20,5	22,7
Bras de Pontho	14,7	15,4	15,8	15,3	17,9
Piton Hyacinthe	9,7	10,2	11,2	11,1	12,7

Hygrométrie moyenne

Mois	Juillet	Août	Septembre	Octobre	Novembre
Bassin Plat	79	75,5	78	80,5	78
Bras de Pontho	77	75,5	84	82,5	78
Piton Hyacinthe	82	81	80	79	80

Précipitations mensuelles

Mois	Juillet	Août	Septembre	Octobre	Novembre
Bassin Plat	114	4,5	39	43,5	-
Bras de Pontho	95	4,6	-	36	1,8
Piton Hyacinthe	107,6	28	80,2	76,4	24,6



Carte 5 : Région de Saint-Pierre (île de la Réunion), avec l'emplacement des trois parcelles d'expérimentations et la précédente zone de collecte de Montvert-les-Hauts.

ILE DE LA REUNION



Figure 3-7a : Parcelle de Bras de Pontho, un mois après plantation, en août 1999



Figure 3-7b : Parcelle de Piton Hyacinthe

Contrairement au Brésil les parcelles étudiées n'étaient pas isolées des autres cultures locales de Brassicacées et la colonisation par les ravageurs et les parasitoïdes peut se faire rapidement. Ainsi, à Bras de Pontho, des choux fortement infestés, car non traités, se trouvaient dans le jardin adjacent à la parcelle et ont très probablement servi de source principale d'infestation par *Plutella xylostella*. A Piton Hyacinthe, d'autres champs de choux étaient présents à moins de 100 m de la parcelle. Les deux parcelles principales de l'étude ont été plantées à une journée d'intervalle et échantillonnées toutes les deux durant 15 semaines.

III.4.2 - Résultats et discussion

III.4.2.1 - Les ravageurs du chou

La principale espèce observée est comme à Brasilia *Plutella xylostella*. Ses populations suivent de la même manière une courbe de croissance logistique, plus typique encore, avec un plateau atteint à la treizième semaine (fig. 3-8). Le total cumulé des individus échantillonnés était de 6 300 à Bras de Pontho et 11 200 à Piton Hyacinthe. A Bassin Plat, par contre, seuls 136 individus ont été collectés en sept semaines d'échantillonnage : la population est restée très réduite.

La croissance des populations de Bras de Pontho et Piton Hyacinthe s'est révélée plus rapide encore qu'à Brasilia, puisque le pic de population est atteint en neuf semaines dans les deux parcelles, avec un coefficient de multiplication hebdomadaire atteignant un facteur 2,5 (fig. 3-9). La population de Piton Hyacinthe est restée inférieure à celle de Bras de Pontho durant les quatre premières semaines, mais s'est ensuite développée plus rapidement et a dépassé numériquement la population de Bras de Pontho, avec des pics de population de 2 200 individus collectés en un seul échantillonnage à Piton Hyacinthe contre 1 600 à Bras de Pontho. Les deux courbes d'évolution affichent cependant une grande ressemblance de forme, y compris dans le ralentissement de la sixième semaine et pour la date du pic. L'analyse statistique, portant sur les nombres d'individus, montre cependant une nette différence, très significative.

	Bras de Pontho	Piton Hyacinthe	t calculé (ddl = 14)
Nombre moyen de <i>P. xylostella</i> récoltées	421,3	745,13	3,9 – p < 0,01

Comme au Brésil au début de la plantation, *P. xylostella* dispose d'une grande quantité de jeunes plantes-hôtes, de bonne qualité nutritive et les parasitoïdes ne sont pas encore en nombre suffisant pour perturber les populations de *P. xylostella* (Guilloux *et al.*, 2000). Il n'y a donc pas de restriction à sa croissance et le ravageur se multiplie ainsi exponentiellement durant neuf semaines, le nombre d'individus par semaine passant alors de 7 à 1500 à Bras de Pontho et de 0 à 2200 à Piton Hyacinthe de la première à la neuvième semaine. Au cours du temps les choux vieillissent et la qualité de la nourriture disponible pour les chenilles décline : la majorité du feuillage a été consommée et les choux forment de nouvelles feuilles plus dures et moins appétantes. De plus les parasitoïdes se développent et ralentissent le développement des populations de *P. xylostella*. La courbe amorce donc une inflexion et se stabilise vers la fin de la culture à la quinzième semaine. Notons que malgré la grande proximité d'autres cultures de choux, les populations initiales de papillons sur les parcelles étaient faibles. Ceci ressemble à la situation observée au Brésil, mais dans ce cas les réservoirs de populations étaient éloignés de plusieurs kilomètres. Notons aussi que l'inflexion de la courbe à la sixième semaine pourrait correspondre au passage de la première à la seconde génération du papillon, laissant supposer un temps de génération de cinq semaines environ, similaire à celui observé ici au Brésil et dans d'autres études (Hardy, 1938 ; Salinas, 1986b).

L'importante différence entre parcelles dans le nombre de *P. xylostella* pourrait être liée en plus à des variations dans la productivité des choux : les choux de Piton Hyacinthe, soumis à un climat plus frais et plus favorable à cette plante, avec peut-être un meilleur sol, se sont mieux développés, offrant une quantité de nourriture plus importante et de meilleure qualité pour les populations de chenilles. A Bras de Pontho les choux sont restés plus petits et moins d'individus ont pu s'implanter. Quant à Bassin Plat, les températures plus élevées et un terrain plus sec ont empêché les jeunes choux de se développer correctement, limitant la population de *P. xylostella* qui n'a jamais entamé de phase de croissance exponentielle : l'inflexion aurait autrement dû être visible pendant les sept semaines d'échantillonnage effectuées.

Cependant les rendements finaux s'avèrent les mêmes sur les parcelles de Bras de Pontho et Piton Hyacinthe (tableau 3-10). Si les choux de Piton Hyacinthe ont été plus gros dans l'absolu, les dégâts infligés par des chenilles de *P. xylostella* plus nombreuses sur cette parcelle ont neutralisé les bénéfices potentiels de cette meilleure croissance. La masse moyenne des pommes de choux consommables, après élimination de toutes les chenilles était inférieure à 800 g. Or une analyse des choux vendus dans un supermarché local (de masse moyenne 3 200 g ; n = 10 choux) montre que cette valeur de 800 g est bien inférieure aux valeurs acceptables commercialement, près de quatre fois supérieures. En prenant comme limite de masse des pommes de choux une valeur de 1 500 g, selon les critères locaux des consommateurs (le plus petit pesé au

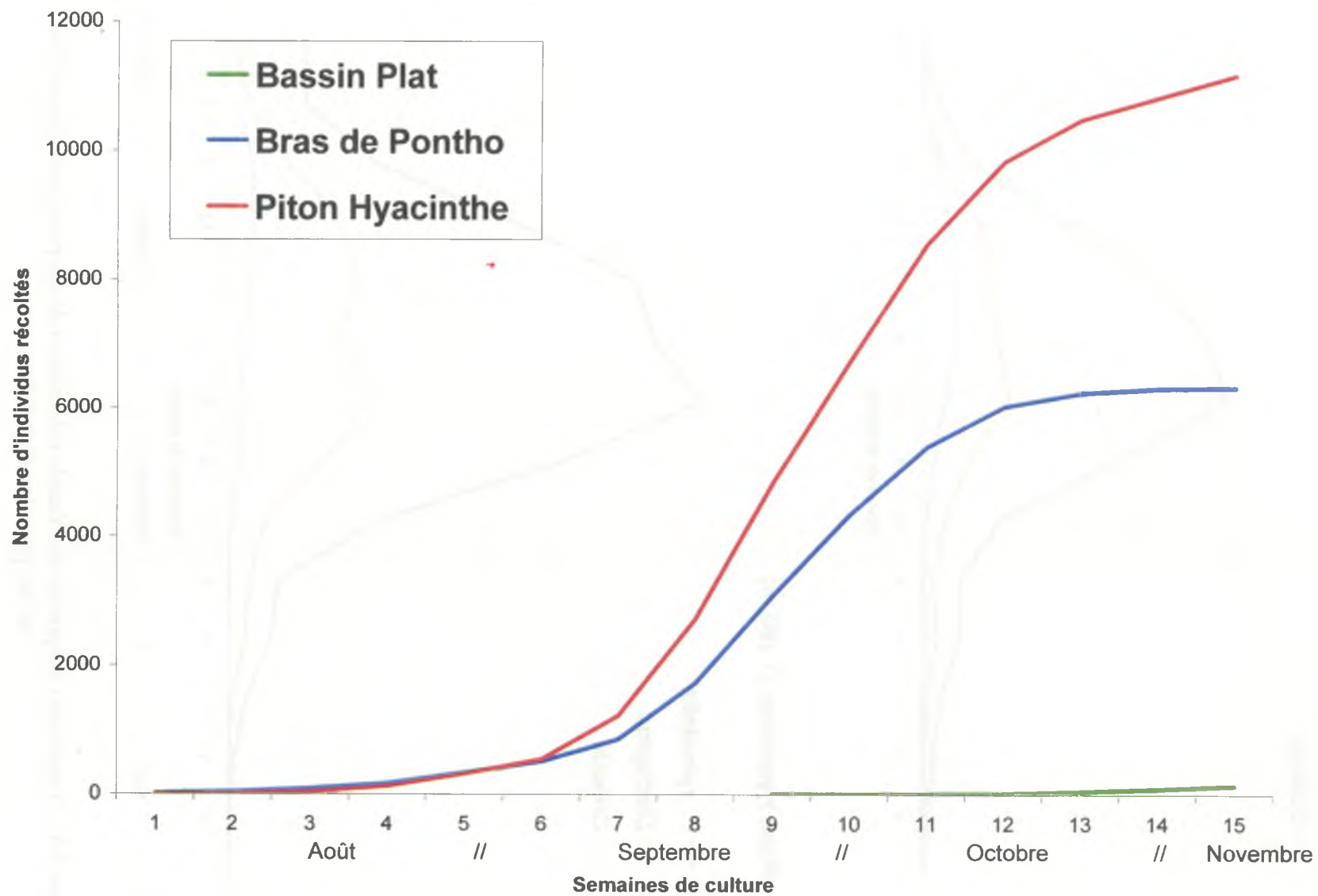


Figure 3-8 : Courbe cumulée des populations de *Plutella xylostella* sur les parcelles de l'île de la Réunion

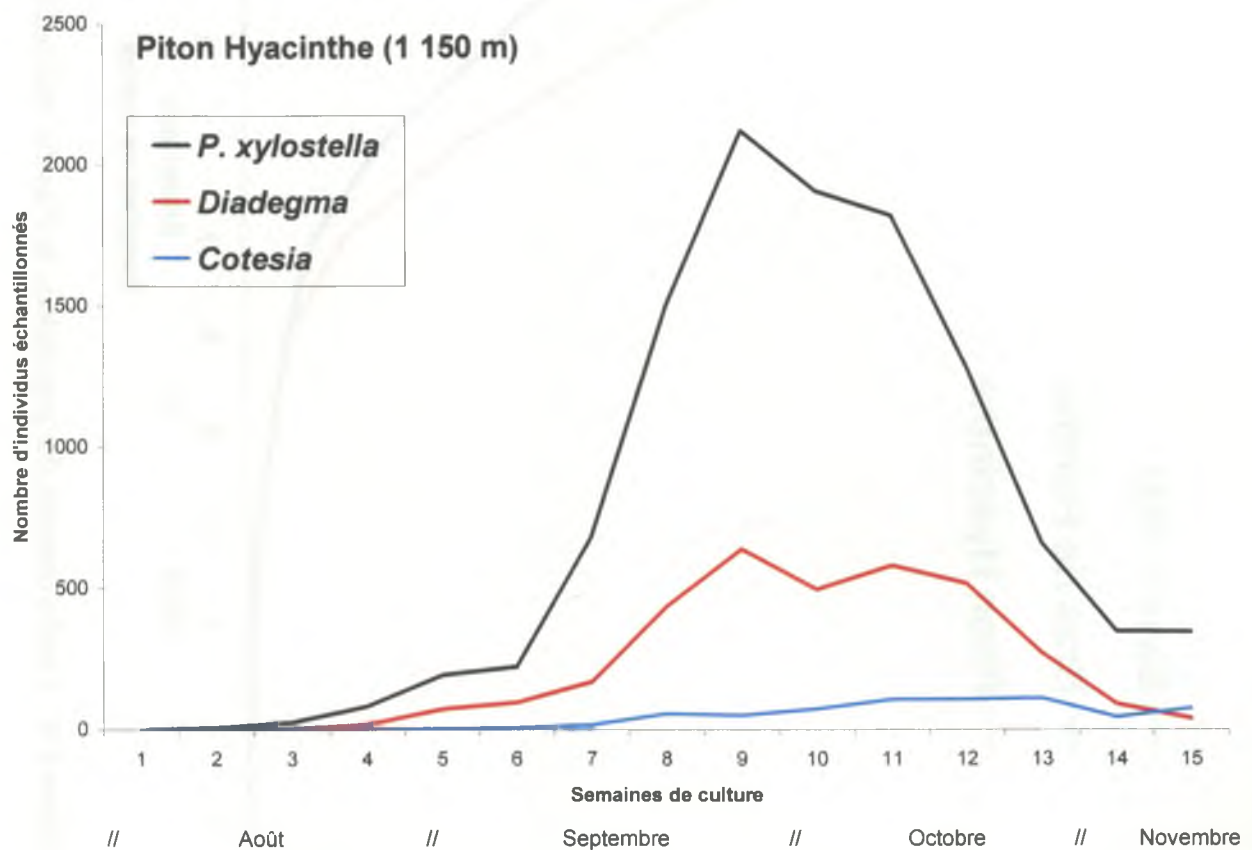
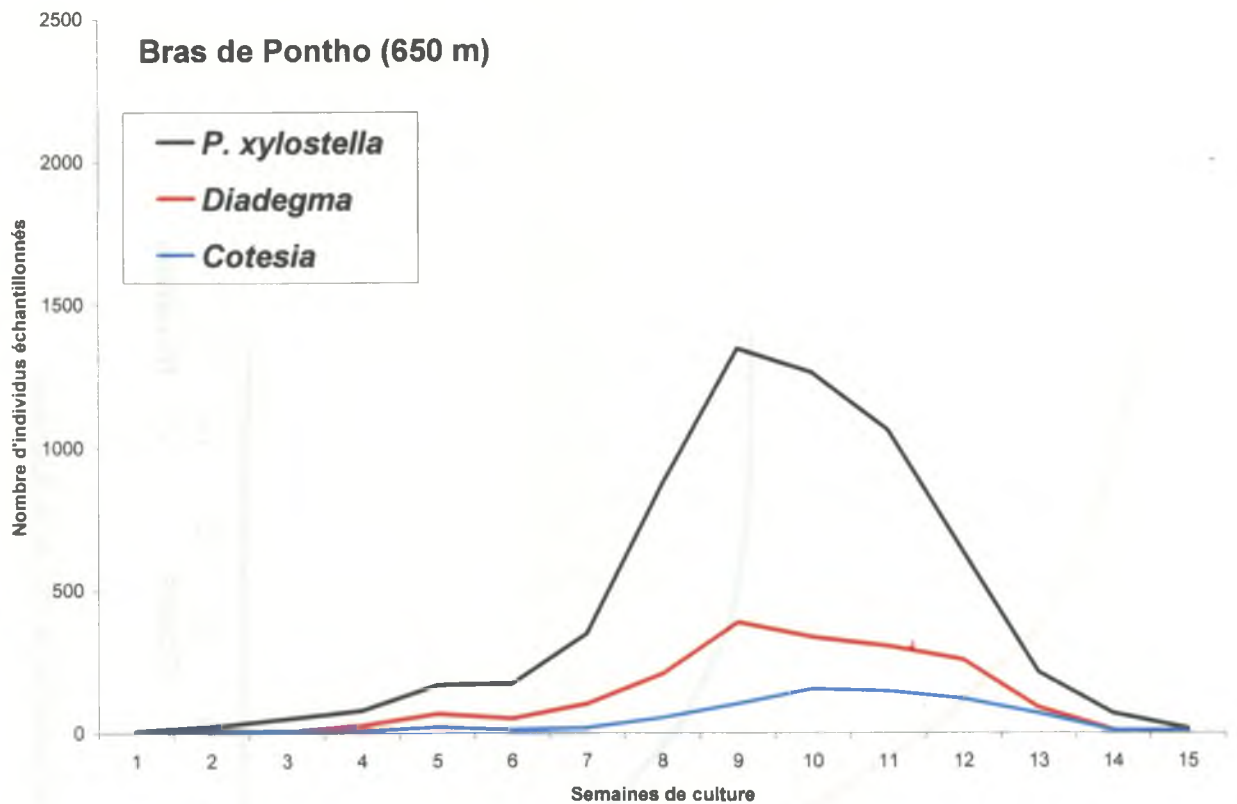


Figure 3-9 : Distribution temporelle de *Plutella xylostella* et de ses principaux parasitoïdes sur les parcelles de la Réunion

supermarché ayant une masse de 1 800 g), nous avons trouvé que seuls 13 choux sur les 120 analysés à Bras de Pontho et Piton Hyacinthe remplissaient cette condition, indiquant un rendement très médiocre : les choux étaient quatre fois moins lourds en moyenne et seul un sur dix était récupérable.

Tableau 3-10 : Rendement des parcelles expérimentales à la Réunion

Parcelle	Bras de Pontho	Piton Hyacinthe
Nombre de choux analysés (env. 800 par parcelle)	60	60
Masse moyenne des pommes de choux (g)	790,4 ± 397,8	794,2 ± 579,3
Masse maximale observée dans l'échantillon (g)	2 050	2 100
Nombre de pommes de choux de masse > 1 500 g	4	9

Une autre interrogation se pose quant à l'abondance de *P. xylostella* à Piton Hyacinthe. A cette altitude, la température moyenne, 10 °C, est à peine au-dessus du seuil thermique de développement de l'espèce (Butts et McEwen, 1981). Des individus de *P. xylostella* élevés en laboratoire à cette température constante ne se développeraient pratiquement pas. Or dans ces conditions nous avons observé ici une phase de croissance des populations du ravageur encore plus rapide qu'à Brasilia, à la même altitude que Piton Hyacinthe mais avec une température moyenne de 22 °C, 12 °C supérieure à celle-ci (Guilloux *et al.*, 2000). Il faut donc admettre que *P. xylostella* se développe durant les heures chaudes de la journée, lorsque la température maximale moyenne relevée par la station météo est de 20 °C et qu'elle est probablement encore supérieure au niveau des choux exposés au soleil. Avec une vitesse de renouvellement des générations de cinq à six semaines, cela signifie que *P. xylostella* arrive ici à se développer presque aussi vite qu'une population de laboratoire qui serait soumise à une température constante de 20 °C. Les mesures de températures moyennes ne semblent ainsi pas permettre d'apprécier correctement la vitesse de développement de l'insecte. Une mesure d'accumulation thermique serait peut-être plus précise. En fait, il faudrait pouvoir mesurer la température corporelle du papillon lui-même pour en déduire son niveau d'activité réel, surtout lorsqu'il est directement exposé au soleil.

De nombreux autres déprédateurs ont été observés sur les choux de la Réunion (tableau 3-11), avec onze espèces additionnelles, dont huit Lépidoptères (contre quatre ravageurs secondaires à Brasilia), mais toujours en faibles quantités et ne provoquant que peu de dégâts comparativement à *P. xylostella* qui reste le ravageur majeur. Les pucerons étaient pratiquement inexistants, contrairement à Brasilia où certains choux en supportaient des milliers. Les aleurodes n'ont été présents que cycliquement tandis que les thrips s'attaquaient essentiellement aux jeunes plants, disparaissant ensuite. *Hellula undalis* F. et *Crociodolomia binotata* (Zeller) (Lep. : Pyralidae) n'ont été observés que sur quelques jeunes plants, à Bassin Plat, et ont provoqué moins de dégâts qu'à Brasilia où *H. undalis* avait fortement endommagé les jeunes choux de la seconde culture. Une unique pupe de *Liriomyza huidobrensis* Blanchard (Dipt. : Agromyzidae) a été collectée à Bras de Pontho.

III.4.2.2 - Les ennemis naturels de *Plutella xylostella*

La faune des parasitoïdes s'est avérée diversifiée, avec sept espèces observées dont deux nouvelles pour la Réunion et une autre non connue de cet hôte (tableau 3-12).

Par ordre d'abondance nous avons observé :

- *Diadegma* sp. (Hym. : Ichneumonidae), espèce différente de celle du Brésil et indéterminée. Elle est largement majoritaire, puisque presque quatre parasitoïdes sur cinq trouvés appartiennent à cette espèce. Sa sex-ratio est de 0,90 (n = 4 282 individus).

- *Cotesia plutellae*, observé depuis moins de cinq années à la Réunion, est cependant présent en abondance : un parasitoïde sur cinq appartient à cette espèce. Sa sex-ratio est de 0,90 (n = 805 individus).

Ces espèces sont ainsi à elles deux responsables de plus de 99 % du parasitisme total observé à l'île de la Réunion. On a donc ici aussi un petit groupe d'espèces dominantes, comme au Brésil, les autres espèces étant extrêmement minoritaires.

- *Oomyzus sokolowskii* est une espèce régulièrement présente dans les échantillons mais toujours à faible densité. On observe en moyenne 10,5 individus qui émergent de chaque nymphe parasitée (n = 27 nymphes observées), contre 8,3 au Brésil ici (n = 301), 8,6 en Inde (n = 246) (Ooi, 1988) et plus de 12 en Afrique du Sud (Smith, comm. pers.).

- *Tetrastichus howardi* (Olliff) (Hym. : Eulophidae), aussi connu sous le nom de *T. ayyari* ou de *T. israeli* (Fitton & Walker, 1992), est un parasitoïde nymphal.

Tableau 3-11 : Ravageurs observés sur les parcelles d'étude de la Réunion

Ordre	Famille	Genre	espèce	Descripteur	Localisation*
Lepidoptera	Yponomeutidae	<i>Plutella</i>	<i>xylostella</i>	(L.)	BPL, BP, PH
	Pyrilidae	<i>Hellula</i>	<i>undalis</i>	(F.)	BPL
		<i>Crocitolomia</i>	<i>binotalis</i>	(Zeller)	BPL
	Noctuidae	<i>Athetis</i>	<i>ignava</i>	(Guenée)	PH
		<i>Ctenoplusia</i>	<i>limbirena</i>	(Guenée)	BP, PH
		<i>Helicoverpa</i>	<i>armigera</i>	(Hübner)	PH
		<i>Spodoptera</i>	<i>littoralis</i>	Boisduval	BPL, BP, PH
		<i>Trichoplusia</i>	<i>orichalcea</i>	(F.)	BP, PH
Homoptera	Aphidae	<i>Brevicoryne</i>	<i>brassicae</i>	(L.)	BPL, BP, PH
	Aleurodidae	<i>Bemisia</i>	sp.		BPL, BP, PH
Diptera	Agromyzidae	<i>Liriomyza</i>	<i>huidobrensis</i>	(Blanchard)	BP
Thysanoptera		Non déterminés			BPL, BP, PH

* : BPL : Bassin Plat ; BP : Bras de Pontho ; PH : Piton Hyacinthe.

Tableau 3-12 : Parasitoïdes observés sur les populations de *Plutella xylostella* à la Réunion

Genre	espèce	Descripteur	Famille	(%)*	Localisation#
<i>Diadegma</i>	sp.		Ichneumonidae	78,7	BPL, BP, PH
<i>Cotesia</i>	<i>plutellae</i>	(Kurdjumov)	Braconidae	20,6	BPL, BP, PH
<i>Oomyzus</i>	<i>sokolowskii</i>	(Kurdjumov)	Eulophidae	0,33	BPL, BP
<i>Tetrastichus</i>	<i>howardi</i>	(Olliff)	Eulophidae		
<i>Itoplectis</i>	sp.		Ichneumonidae	0,22	BP, PH
<i>Apanteles</i>	sp.		Braconidae	0,12	BP
<i>Trichogramma</i>	<i>chilonis</i>	Ishii	Trichogrammatidae	-	BP, PH

* : pourcentage parmi les chenilles parasitées

: BPL : Bassin Plat ; BP : Bras de Poncho ; PH : Piton Hyacinthe.

Confondu avec *O. sokolowskii* dans cette étude, on peut seulement indiquer que ces deux espèces ont occasionné ensemble un taux de parasitisme de 0,33 %. Il s'agit d'un taux normal pour ces deux parasitoïdes, qui sont toujours présents à la Réunion mais jamais abondants. Quoique déjà signalé sur *P. xylostella* à la Réunion, *T. howardi* est un parasitoïde originellement introduit il y a environ 25 ans sur l'île pour lutter contre *Chilo sacchariphagus* (Bojer) (Lep. : Pyralidae) (Etienne, 1973). Cependant dans d'autres régions du monde, surtout en Asie, c'est un parasitoïde plus commun de *P. xylostella* (Fitton & Walker, 1992).

Quant aux deux nouvelles espèces, *Apanteles insignicaudatus* (Hym. : Braconidae), tout juste identifié, et *Itopectis* sp. (Hym. : Ichneumonidae), elles ne sont représentées que par de rares individus, récoltés dans les dernières semaines de l'étude et il n'est pas possible de réaliser des calculs à valeur significative sur ces espèces. *Apanteles insignicaudatus* est un parasitoïde larvaire, déjà observé à la Réunion sur un lépidoptère ravageur de l'artichaut. *Itopectis* sp. semble être un parasitoïde nymphal car tous les individus observés ont émergé de nymphes directement collectées sur les parcelles mais jamais de nymphes formées dans le laboratoire, à l'abri des parasitoïdes. Seuls des mâles de *Itopectis* sp. ont été collectés, empêchant la détermination spécifique de ce parasitoïde.

Notons aussi la présence de *Trichogramma chilonis* Ishii (Hym. : Trichogrammatidae), présent sur les œufs de *P. xylostella* et non pris en compte dans les analyses pour cette raison. Des observations sur des plantes-pièges portant des pontes de *P. xylostella* et installées sur les parcelles permettent d'estimer son taux de parasitisme à approximativement 3-5 %, dans ces conditions de mesure. Il s'agit d'une espèce à vaste répartition indo-pacifique, connue depuis plus de 15 ans à la Réunion sur les œufs de *Chilo sacchariphagus* (Pintureau & Babault, 1988).

Certains parasitoïdes interviennent rapidement sur les parcelles, surtout *Diadegma* sp. dont le pic d'évolution des populations coïncide avec celui des populations du ravageur *P. xylostella*. *Cotesia plutellae* intervient plus tardivement, la population de Bras de Pontho atteignant sa valeur maximale lors de la dixième semaine, sans qu'il y ait de pic marqué. Pourtant la distance pour passer d'un champ de choux à un autre était plus réduite que celle entre les parcelles de l'Embrapa-Hortaliças, au Brésil, et la découverte de chenilles de *P. xylostella* à parasiter devait ainsi être plus aisée.

La rareté de *O. sokolowskii* pourrait être due, comme au Brésil, à son comportement densité-indépendant qui ne lui permet pas de suivre les rapides fluctuations de population observées ici chez *P. xylostella*.

Les préférences des parasitoïdes pour les stades larvaires du ravageur ne peuvent être étudiées que chez *Diadegma* sp. et *C. plutellae*, seuls présents en nombre suffisant pour obtenir des résultats significatifs. Le modèle log-linéaire est utilisé à nouveau.

Chez *Diadegma* sp., il révèle une augmentation significative du taux de parasitisme entre le stade L2 et le stade L3 ($P < 0,0001$) puis entre L3 et L4 ($P < 0,05$) (tableau 3-13). Concernant *C. plutellae*, il y a augmentation significative du taux de parasitisme de L2 à L3 ($P < 0,0001$) et une augmentation, non significative cependant, de L3 à L4 (tableau 3-14).

On retrouve ici les résultats enregistrés pour *Diadegma leontinae* au Brésil : cette augmentation du taux de parasitisme en passant d'un stade à l'autre indique une absence de préférence des parasitoïdes dans les stades des chenilles attaquées, ou tout au moins trop faible pour être détectable. L'augmentation observée du taux de parasitisme chez les chenilles plus âgées est simplement la résultante d'une plus longue durée d'exposition de celles-ci aux ennemis naturels dans les champs.

Ces résultats diffèrent d'observations antérieures sur ces espèces : le même *Diadegma* sp. de la Réunion observé en laboratoire ne manifestait pas de préférence nette entre les chenilles de stade L2 ou L3, mais attaquait L4 avec moins de succès (Monnerat, 1995). De plus il ne se développait plus en laboratoire dès que la température (constante) d'élevage était inférieure à 20 °C ; enfin il présentait une sex-ratio de 1,3 à 1,5 mâles pour 1 femelle, contre 0,90 observé ici ($n = 4\ 282$). En ce qui concerne d'autres espèces, *Diadegma eucerocephala* Horstm de Taïwan et d'Indonésie attaque L2 et L3, mais pas L4 (Talekar et Yang, 1991) et *Diadegma leontinae* du Brésil attaque tous les stades, sans distinction (sa sex-ratio est de 1,11 ; $n = 1\ 916$) (Guilloux *et al.*, 2000).

Cotesia plutellae est connu pour éviter le stade L4 (Lloyd, 1940 ; Velasco, 1982 ; Mushtaque et Mohyuddin, 1987), même si certaines populations sont capables de le parasiter (Talekar et Yang, 1991) au moins au début du stade L4 (Shi & Liu, 1998). Ici, il n'y a pas d'augmentation importante du taux de parasitisme chez le stade L4 par rapport au stade L3 (voir annexe 1), ce qui permet de dire que *C. plutellae* de la Réunion parasite extrêmement peu voire pas du tout les chenilles du stade L4. Cette population affiche donc le comportement qui semble le plus commun, à savoir éviter les grandes et vives chenilles L4.

De fortes disparités sont présentes entre parcelles (fig. 3-9) : *Diadegma* sp. s'avère présent à des densités très dissemblables (tableau 3-15). A l'inverse *C. plutellae* est présent en quantités très similaires sur les deux parcelles de Bras de Pontho et Piton Hyacinthe. Comme *Diadegma* sp. est l'espèce majoritaire, on observe également une différence significative sur l'ensemble du cortège parasitaire.

Un phénomène plus curieux apparaît lors du calcul des taux de parasitisme individuels et globaux sur chaque parcelle (non comparable statistiquement à cause de la grande variabilité temporelle de ces taux (E. Gozé, comm. pers.)). Le taux global de parasitisme ne varie pas d'une parcelle à l'autre : il reste constant, compris entre 46 et 48 %, malgré les conditions climatiques différentes auxquelles les parcelles sont

Tableau 3-13 : Préférences alimentaires de *Diadegma* sp. sur les stades L2 à L4 des chenilles de *Plutella xylostella* à la Réunion

Stade larvaire	d.d.l	Estimation	Erreur-type	χ^2	Probabilité
L2	1	- 0,31	0,065	22,3	0,0001
L3	1	- 0,13	0,067	4,04	0,044
L4	0	0	0	-	-

Tableau 3-14 : Préférences alimentaires de *Cotesia plutellae* sur les stades L2 à L4 des chenilles de *Plutella xylostella* à la Réunion

Stade larvaire	d.d.l	Estimation	Erreur-type	χ^2	Probabilité
L2	1	- 0,43	0,11	15,4	0,001
L3	1	- 0,13	0,10	1,6	0,21 - NS
L4	0	0	0	-	-

Tableau 3-15 : Nombre moyen de parasitoïdes observés sur *Plutella xylostella* dans les échantillonnages hebdomadaires de choux sur les parcelles de la Réunion

Parasitoïdes	Bras de Pontho	Piton Hyacinthe	t calculé (ddl = 14)
<i>Diadegma</i> sp.	123,5	227,5	3,67 – p < 0,01
<i>Cotesia plutellae</i>	48,9	42,9	0,75 - NS
Ensemble des parasitoïdes	173,9	271,2	2,87 – p < 0,05

Tableau 3-16 : Taux global de parasitisme observé sur les trois parcelles de la Réunion

Localité	Altitude (m)	Nombre of parasitoïdes	<i>Diadegma</i> (%)	<i>C. plutellae</i> (%)	Autres (%)	Taux global (%)
Bassin Plat	150	56	15,6%	26,2 %	4,1 %	45,9 %
Bras de Pontho	650	2 620	34,0 %	13,5 %	0,5 %	48,0 %
Piton Hyacinthe	1 150	4 079	39,4 %	7,4 %	0,2 %	47,0 %

soumises (tableau 3-16). Par contre on observe des gradients altitudinaux dans la répartition des parasitoïdes, à savoir une diminution graduelle du taux de parasitisme par *C. plutellae*, majoritaire à Bassin Plat, mais minoritaire à Bras de Poncho et plus encore à Piton Hyacinthe. Le "complexe" *O. sokolowskii* + *T. howardi* affiche un comportement identique, avec même une absence complète à Piton Hyacinthe. A l'opposé *Diadegma* sp. devient de plus en plus abondant quand l'altitude augmente, et *Itopectis* sp. pourrait bien faire de même.

Il semblerait donc qu'on ait des espèces à préférences thermiques opposées: *C. plutellae* et *O. sokolowskii* + *T. howardi* apparaissent plus thermophiles, préférant des températures de 20 °C et plus. A l'opposé *Diadegma* sp. serait plus psychrophile et vit très bien à Piton Hyacinthe avec une température moyenne d'à peine 10 °C. Ce phénomène a déjà été observé en Malaisie, dans les Cameron Highlands, ainsi qu'à Taïwan après introduction de *Diadegma semiclausum* Hellen (Hym. : Ichneumonidae) pour renforcer l'action de *C. plutellae* : le premier s'est bien implanté dans les zones d'altitude, au-delà de 1 000 m, le second restant plutôt dans les zones de plaine (Talekar *et al.*, 1992 ; Syed *et al.*, 1997).

Il faut cependant peut-être relativiser un peu ces observations dans la mesure où le ravageur *P. xylostella*, qui est lui-même thermophile, vit cependant très bien à Piton Hyacinthe. Mais comme l'amplitude thermique augmente avec l'altitude et qu'il fait chaud dans la parcelle de Piton Hyacinthe en journée, il est cependant possible que l'accumulation thermique sur cette parcelle soit aussi élevée que sur les autres champs de plus basse altitude, autorisant ainsi un développement tout aussi rapide du papillon. Il faudra donc prendre en compte des paramètres de mesure climatologiques plus poussés pour expliquer ce comportement de *P. xylostella* et de *Diadegma* sp.

III.4.2.2 - Hyperparasites

Seuls deux spécimens d'hyperparasites ont été obtenus au cours de l'étude : il s'agit de deux *Trichomalopsis oryzae* (Risbec) récoltés sur des cocons de *Diadegma* sp. Cette espèce est cependant régulièrement observée à la Réunion ; observée à la fin de l'étude, comme *Apanteles insignicaudatus* et *Itopectis* sp., cette espèce pourrait préférer l'été austral plus chaud, d'autant plus qu'un échantillon reçu en février 2000 contenait justement *T. oryzae* en proportion plus élevée. Cet envoi contenait aussi *Notanisomorphella borborica* (Giard) (Hym. : Eulophidae), observé pour la première fois sur *Diadegma* sp. et *C. plutellae*. Il s'agit habituellement d'un parasitoïde très polyphage des nymphes de Lépidoptères (Delvare, comm. pers.).

III.5 - Perspectives

Il sera nécessaire dans l'avenir de poursuivre les échantillonnages pour observer le devenir de certaines espèces : *C. plutellae* et *Actia* sp. au Brésil, afin de déterminer si leur raréfaction est seulement un phénomène transitoire ou un changement plus profond du cortège parasitaire local. A la Réunion, c'est le devenir des nouvelles espèces qu'il serait intéressant de suivre. Ceci concerne *C. plutellae* qui fait déjà partie des parasitoïdes majoritaires à la Réunion seulement cinq années après sa découverte. Mais c'était une espèce abondante autrefois à Brasilia : quel sera donc son comportement à long terme à la Réunion alors qu'une espèce d'*Apanteles* est maintenant présente également ? *Diadegma* sp. à la Réunion est un compétiteur moins sérieux de *C. plutellae* car ils n'ont pas les mêmes préférences thermiques, mais *Apanteles insignicaudatus* pourrait par contre avoir des préférences similaires.

Ces quelques mois d'étude ne représentent qu'un aperçu de l'évolution globale des populations de *P. xylostella* et de ses auxiliaires et seul un suivi à long terme, c'est-à-dire plusieurs années d'affilée, permettra de suivre les variations inter-saisonnières et interannuelles qui ne peuvent manquer de se produire. De la même manière, la variabilité géographique est importante : quelques kilomètres d'écart suffisent à changer la composition de la faune des parasitoïdes, et les variations peuvent être encore plus importantes à l'échelle d'un pays : ainsi l'étude de Ferronato et Becker dans le sud du Brésil, en 1984, montrait une composition très différente de la faune de parasitoïdes chez *P. xylostella* (notamment l'absence d'hyperparasites). Il faut aussi se demander comment toutes ces espèces ont pu apparaître en quelques décennies seulement sur les lieux d'expérimentation, surtout au Brésil où aucune culture n'existait avant la création de la ville.

La constance du taux de parasitisme observée à la Réunion surtout soulève une autre interrogation si elle se maintient dans le temps : doit-on supposer que sous les conditions climatiques qui règnent à la Réunion il est difficile pour les parasitoïdes d'attaquer plus de 50 % des chenilles, et que cette limite subsiste quelle que soit l'altitude alors que la proportion des espèces varie en fonction du gradient thermique ?

Ceci implique de plus que la seule action des parasitoïdes reste insuffisante pour réguler les pics de population de *P. xylostella* : il est donc nécessaire de renforcer l'action des parasitoïdes par d'autres traitements plus rapides lors des pics et donc d'envisager l'utilisation de la lutte intégrée. Sinon les dégâts engendrés par *P. xylostella* sur les récoltes resteront trop importants pour être tolérables. La situation est similaire au Brésil où *P. xylostella* revient très vite infester les champs à la saison sèche malgré la forte réduction de ses populations durant la saison des pluies, alors que les parasitoïdes

semblent avoir plus de mal à se réimplanter, ce qui aboutit à un taux de parasitisme très faible.

L'ajout de paramètres de mesures supplémentaires semble nécessaire pour mieux analyser certaines des variations observées : au Brésil il faudrait surtout placer des anémomètres au sein des parcelles et des pièges à glu sur leur périmètre pour observer les éventuels déplacements d'insectes entre parcelles proches ; à la Réunion, ce sont les mesures d'accumulation thermique ou d'insolation qui pourraient s'avérer significatives pour expliquer comment les insectes arrivent à se développer aussi rapidement par une température moyenne de l'air de 10 °C.

La séparation des chenilles par stade larvaire permet d'apporter des informations sur les préférences des parasitoïdes pour chacun de ces stades, mais uniquement s'ils sont présents en grande quantité, ce qui n'est pas le cas de toutes les espèces. Dans ce cas, des mesures de laboratoire s'avéreraient nécessaires. Cependant, des divergences peuvent apparaître entre mesures de terrain et mesures de laboratoire et il faut se demander si ces dernières, basées sur des populations d'élevage, reflètent exactement la réalité. Le parasitoïde dans les conditions naturelles doit faire face à des compétiteurs, à des conditions climatiques variables et à d'autres facteurs non reproduits dans des cages d'élevage. L'élevage permet par contre de contrôler précisément les paramètres d'étude, ce qui pourrait permettre de révéler des différences physiologiques entre populations qu'on ne pourrait détecter en milieu naturel à cause des autres facteurs de variation présents.

La séparation des chenilles par stade offre par contre un avantage certain, celui de permettre de calculer plus précisément le taux de parasitisme effectif des espèces (Waage & Cherry, 1992). Pour des espèces peu sélectives comme *C. plutellae*, le stade L4 s'avère préférable car les chenilles ont pu être piquées à tous les stades antérieurs, et il faut attendre la fin du cycle larvaire pour être sûr de prendre en compte tous les stades susceptibles d'être attaqués. Pour *Apanteles* sp. du Brésil, par contre, sa spécificité pour le stade L2 fait qu'un calcul basé sur un échantillonnage de chenilles de stades L3 ou L4, par exemple, donnerait le même résultat puisque le taux de parasitisme n'augmente plus avec le temps. Dans le cas des parasitoïdes nymphaux, la collecte de chenilles n'offre évidemment aucun intérêt.

CHAPITRE IV

Analyses biochimiques : polymorphisme enzymatique

ΕΠΙΣΤΗΜΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΕΠΙΣΤΗΜΟΛΟΓΙΑ
ΤΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΛΟΓΙΑ

IV.1 - Matériel biologique utilisé

Les hyménoptères possèdent un système de reproduction particulier, dit haplodiploïde, où la détermination du sexe se fait au choix de la femelle, selon qu'elle fécondera ou pondra directement ses ovules (à l'exception des espèces parthénogénétiques) (Quicke, 1997). Quand la femelle féconde un ovule, elle ouvre pour cela l'orifice de sa spermathèque où sont stockés les spermatozoïdes issus de l'accouplement (fig. 2-3) (Chapman, 1982) : quelques gamètes sont alors libérés et l'ovule est fécondé, donnant un oeuf diploïde qui engendrera une femelle. Si la spermathèque est maintenue fermée, il n'y a pas de fécondation et l'ovule se développe en donnant un individu haploïde, qui sera mâle. Génétiquement les mâles reflètent ainsi directement le génome maternel, mais seulement la moitié de celui-ci. Les femelles ont pour leur part un génome contenant pour moitié des caractères issus de l'ADN paternel et pour moitié issus du génome maternel.

De par cette particularité, les *C. plutellae* mâles seront utilisés pour l'analyse biochimique : leur haploïdie implique l'absence d'hétérozygotie, ce qui simplifie considérablement la lecture et l'interprétation des gels d'électrophorèse. Un inconvénient est l'extraction de deux fois moins d'informations génétiques de chaque individu, nécessitant donc d'analyser deux fois plus de spécimens.

Une seconde raison est l'utilisation préférentielle des femelles pour une autre analyse, celle des polydnavirus symbiotes, ces derniers n'étant extrayables que des ovaires, après dissection (cf. chap. V). Etant donné les faibles dimensions de *C. plutellae*, le restant de l'individu n'est pas récupérable pour l'analyse biochimique.

Les mâles issus des élevages sont anesthésiés et directement congelés à - 81 °C jusqu'à utilisation. Les cinq populations étudiées étaient originaires : du Bénin (champs à la périphérie de Cotonou) ; de l'île de la Réunion (à Montvert-les-Hauts, altitude 600 m – cf. carte 5) ; de Taïwan (région de Tainan), cette population étant utilisée en remplacement du Brésil où *C. plutellae* n'a pu être collecté en quantités suffisantes ; de Hong-Kong (collectée par A. Kirk en 1997) et d'Afrique du Sud (population de laboratoire, collectée près de Prétoria).

IV.2 - L'électrophorèse sur gels d'acétate de cellulose

Cette technique a été choisie ici pour les raisons suivantes :

- 1) Grande sensibilité, avec des volumes de dépôts très faibles : 0,5 µl. Un seul individu de *C. plutellae* peut ainsi être testé pour plus d'une dizaine de systèmes enzymatiques.

2) Simplicité de préparation, grâce à l'utilisation de gels prêts à l'emploi et de solutions de révélation se préparant à l'aide de simples compte-gouttes.

3) Rapidité de migration : 15 à 30 minutes suffisent pour la majorité des systèmes.

4) Connaissance de cette technique, déjà utilisée en stage de DEA, et ayant permis de différencier des pucerons, pourtant parthénogénétiques (Bournoville *et al.*, 2000).

D'un autre côté, cette technique comporte certains inconvénients :

1) Résolution théoriquement inférieure aux autres systèmes électrophorétiques : la migration des protéines se fait dans le film de liquide à la surface du gel, et non pas dans le gel lui-même. La séparation se fait donc essentiellement en fonction de la charge électrique, la forme et la dimension des protéines ne jouent théoriquement aucun rôle. En pratique, on ne peut négliger les courants d'électroendosmose élevés sur ce type de gel, qui influent aussi sur la résolution des allozymes (Murphy *et al.*, 1996).

2) Le nombre de systèmes révélabes est limité à une trentaine, ce qui est cependant suffisant si on trouve suffisamment de systèmes polymorphes dans cet ensemble.

3) Un seul système, parfois deux, est révélabes sur chaque gel, contrairement aux gels d'amidon et sur 12 échantillons seulement. Mais le volume d'extrait enzymatique issu d'un seul individu de *C. pluteae* autorise plusieurs essais.

4) Les migrations sont parfois imparfaites, avec un front de migration irrégulier qui peut empêcher l'interprétation, surtout au niveau des dépôts latéraux.

IV.3 - Protocole

IV.3.1 - Extraction

On utilise ici un tampon à base d'EDTA / SDS / DTT / NADP, aux concentrations respectives 10 mM ; 0,25 % ; 2 mM ; 0,2 %, à pH 7,4. Toutefois d'autres formules existent et une extraction à l'eau pure est possible à défaut d'autres réactifs.

L'EDTA (Ethylène Diamine TetraAcetic Acid) est un chélatant, qui capte les ions Ca^{2+} dans les sites actifs des protéases et inhibe ainsi ces enzymes. Ceci réduit la dégradation des autres protéines dont les systèmes enzymatiques recherchés. Le SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) est un détergent membranaire, libérant les protéines intégrées aux membranes cellulaires. Le DTT (DiThioThréitol) protège les ponts disulfures dans les enzymes, qui conservent ainsi mieux leur structure tertiaire et leur activité. Finalement le NADP (Nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate) est un cofacteur préservant l'activité de certaines enzymes labiles.

Les individus mâles de *C. plutellae*, provenant des stocks congelés, sont déposés individuellement au fond de microtubes de 1,5 ml disposés sur un lit de glace pilée pour empêcher la dégradation tissulaire résultant d'un dégel prématuré. On ajoute alors 5 µl de tampon d'extraction et on broie à l'aide d'un "piston" couplé à un petit broyeur électrique manuel. Après 10 à 20 secondes de broyage, on enlève le piston en récupérant le maximum du liquide qui y adhère. Les échantillons, préparés par séries de 12 à cause du système de chargement des gels, sont centrifugés 5 min à 15 000 rpm. Le surnageant a un volume légèrement variable (4-6 µl) selon la taille de l'individu broyé et la quantité de liquide restée sur le piston.

IV.3.2 - Dépôt des échantillons et migration

Nous avons utilisé une variante de l'électrophorèse sur acétate de cellulose basée sur un matériel spécifique développé par Helena Laboratories. Destiné originellement à des analyses médicales, il s'est révélé utile pour l'étude des petits invertébrés (Easteal & Boussy, 1987) et des protocoles ont été développés à cet effet. Celui de Hebert & Beaton (1993) est suivi ici.

Le matériel consiste d'une part en gels prêts à l'emploi : ils sont constitués par une fine couche d'acétate de cellulose déposée sur un support plastique, de dimensions 78x78 mm pour le modèle considéré (Titan-III). Stockables sans précautions particulières à l'état sec, ils sont préparables en 20 min par trempage dans le tampon de migration peu avant l'emploi.

D'autre part on dispose d'un kit d'application, formé d'un ensemble de 12 puits où l'on dépose les surnageants des 12 échantillons après la centrifugation ; d'un applicateur à 12 oses calibrées, prélevant 0,5 µl lors du trempage dans les 12 puits et d'une plaque recevant à la fois l'applicateur chargé d'extrait enzymatique et le gel humecté de tampon. Par pression sur l'applicateur on réalise 12 dépôts simultanés et le gel est prêt à la migration. On le place immédiatement dans la cuve de migration car il ne doit pas y avoir dessèchement à cette étape : si le film de liquide disparaît, la continuité électrique est rompue et la migration impossible, sans compter la dégradation des protéines par dessèchement.

On peut réappliquer de l'extrait enzymatique par une deuxième application si l'enzyme testée est peu réactive, mais les dépôts deviennent moins nets et la résolution plus faible. Comme dans toute électrophorèse, il faut tester simultanément plusieurs populations pour avoir des éléments de comparaison d'une population à l'autre au moment de l'interprétation. La reproductibilité d'une migration n'est jamais parfaite et cette technique n'est pas la meilleure de ce point de vue.

La cuve est formée par deux réservoirs séparés et peut accepter deux gels. Le contact avec le gel se fait par l'intermédiaire de bandes de papier filtre installées en

permanence dans la cuve, la plaque de gel étant déposée avec la couche d'acétate de cellulose vers le bas pour compléter le circuit électrique (figure 4-1). On lance alors l'électrophorèse, sous une tension de 190 V (excepté pour quelques systèmes migrant à 130 V). La durée de migration est habituellement de 20 à 25 minutes, pouvant être portée à 45 minutes pour des systèmes "lents". Un marqueur de front de migration n'est pas nécessaire pour ces courtes électrophorèses. La migration peut se dérouler à température ambiante, la dégradation enzymatique étant très limitée pendant son déroulement. Les cuves sont conservées au réfrigérateur entre les manipulations, pour limiter la dégradation des tampons.

Seuls deux tampons de migration sont nécessaires lors de ces expériences, étant signalés comme donnant des résultats corrects pour la majorité des systèmes testables (Hebert & Beaton, 1993). Le premier est le tampon CAAPM (Acide Citrique + 3-AminoPropyl-Morpholine, pH 7,0), réutilisable 10 à 15 fois et le second est un tampon Tris-Glycine (pH 8,5, disponible chez Sigma par ex.), réutilisable jusqu'à une centaine de fois. Deux cuves à électrophorèse, chacune avec l'un de ces tampons, suffisent pour mener à bien les expériences. C'est un système très robuste et faible consommateur de réactifs.

Le tampon CAAPM est meilleur conducteur de l'électricité et les gels placés dans ce tampon subissent une intensité théorique de 8 mA (contre 2 mA pour le tampon Tris-Glycine). Dans la pratique l'intensité dépasse parfois 20 mA et le gel surchauffe : il faut alors limiter la durée de migration avec ce tampon et bien refroidir la cuve, en plaçant sur le couvercle une plaque de glace ou un bloc accumulateur de froid.

IV.3.3 - Révélation

Elle se fait en milieu solide, dans une couche d'agar coulée sur le gel. Le substrat diffuse vers l'enzyme à la surface du gel, et les produits de réaction obtenus diffusent aussi, formant une bande colorée.

On prépare une solution d'agar à 1,6 % que l'on maintient ensuite à 60 °C en étuve jusqu'à utilisation. Séparément, on prépare la solution de révélation souhaitée (les principales recettes sont données en annexe 2). On mélange cette solution à quelques ml d'agar liquide et on coule l'ensemble sur le gel maintenu horizontalement, que l'on vient juste d'ôter de la cuve (il ne doit pas se dessécher à ce moment non plus). Le mélange se solidifie en quelques dizaines de secondes et la révélation commence. On place l'ensemble à l'obscurité, certains réactifs étant photosensibles, et éventuellement à l'étuve (37 °C) pour accélérer le processus. Le temps de révélation varie de quelques dizaines de secondes, pour les systèmes les plus réactifs, à quelques heures. Si rien n'apparaît après ce laps de temps, on peut considérer la révélation comme ratée, soit parce que l'enzyme recherchée était trop peu concentrée, soit parce que

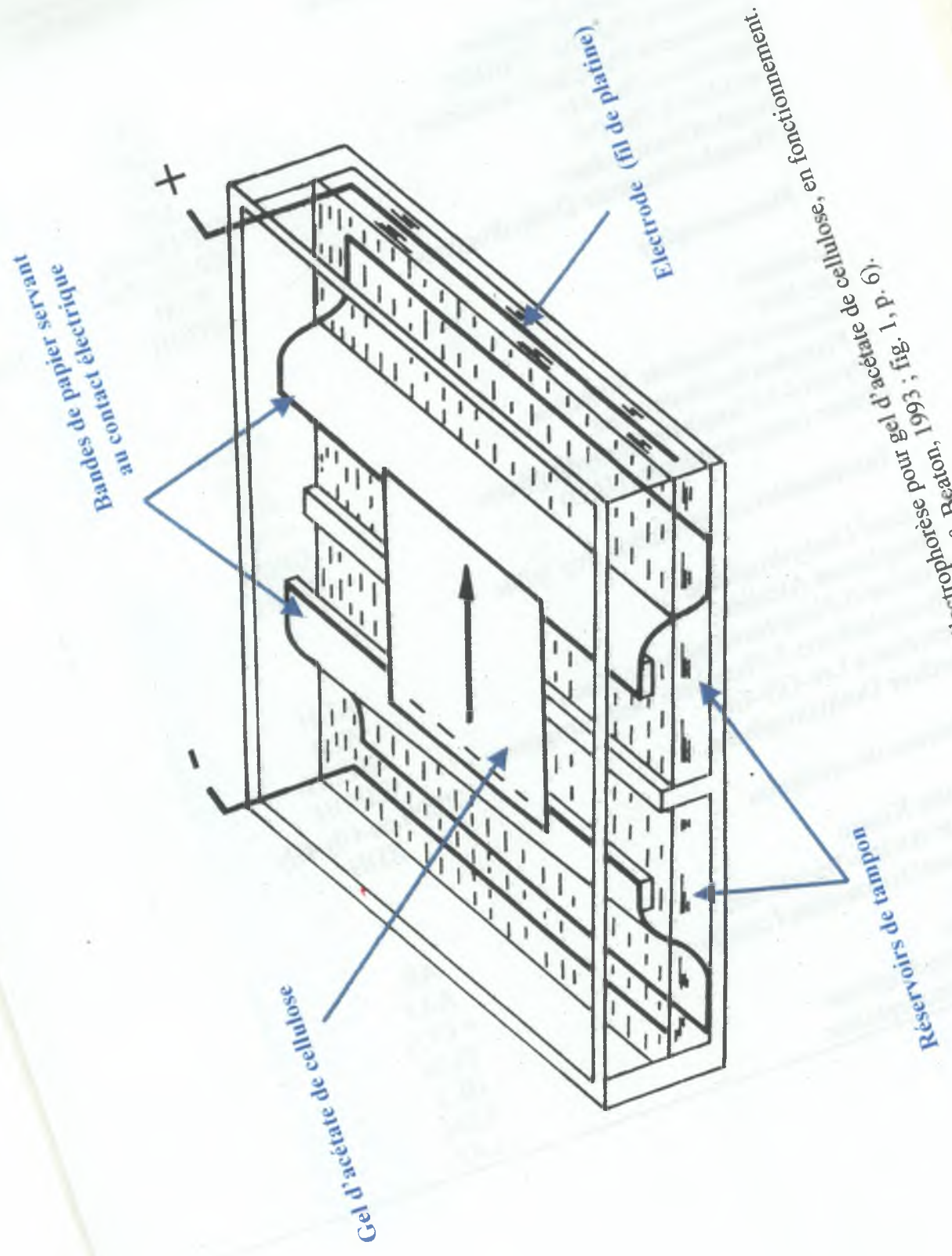


Figure 4-1 : Schéma d'une cuve à électrophorèse pour gel d'acétate de cellulose, en fonctionnement.
(D'après Hebert & Beaton, 1993 ; fig. 1, p. 9)

Tableau 4-1 : Systèmes enzymatiques testés chez *Cotesia plutellae*

Systèmes enzymatiques	Abréviation	Nombre de loci
- Polymorphes (sur au moins un locus)		
(Carboxyl)Estérases	EST	Nombreux
Isocitrate Deshydrogénase	IDH	2
" Enzyme Malique " (NADP)	ME	1
Mannose-6-Phosphate Isomérase	MPI	1
Peptidase à Phe-Ala	PEP Phe-Ala	1
Peptidase à Phe-Pro	PEP Phe-Pro	2
PhosphoGlucoMutase	PGM	Nombreux
6-PhosphoGluconate Deshydrogénase	6PGDH	1
- Monomorphes		
Aconitase	ACON	2
Amylase	AMY	2
Glucose-6-Phosphate Isomérase	GPI	1
= PhosphoGlucoIsomérase	= PGI	
Glycérol-3-Phosphate Deshydrogénase	GPDH	3
Malate Deshydrogénase (NAD)	MDH	2
- Inutilisables car révélation trop faible		
Alcool Deshydrogénase	ADH	-
Phosphatase Alcaline	ALP	-
Glucose-6-Phosphate Deshydrogénase	G6PDH	-
Glycéraldehyde-3-Phosphate Deshydrogénase	G3PDH	-
Peptidase à Leu-Gly-Gly	PEP Leu-Gly-Gly	3
Xanthine Deshydrogénase	XDH	-
- Absence de révélation		
Adénylate Kinase	AK	-
Aspartate Amino-Transférase	AAT	-
=GlutamateOxaloacétateTransférase	= GOT	
Fumarase	FUM	-
Hexokinase	HEX	-
Lactate Deshydrogénase	LDH	-
Leucine AminoPeptidase	LAP	-

les conditions de manipulation n'étaient pas adaptées à ce système. La prolongation de la durée de révélation s'avère inutile suite à la dégradation des réactifs et de la couche d'agar.

L'interprétation se fait dès que les bandes recherchées sont assez visibles. On conserve une double trace de la manipulation, d'une part par macrophotographie ou par numérisation du gel placé sur un scanner et d'autre part en laissant sécher le gel après élimination de la couche d'agar : dans ce cas les réactifs qui ont légèrement pénétré dans la couche d'acétate de cellulose laissent des images (pâles) des bandes. Le gel sec peut être stocké assez longtemps mais le contraste est plus faible et une réinterprétation des bandes en cas de doute n'est pas toujours possible.

IV.4 - Résultats et discussion

IV.4.1 - Recherche de systèmes polymorphes

Vingt-cinq systèmes ont été testés dans un premier temps (tableau 4-1), sur une soixantaine d'individus pris au hasard parmi les populations de *C. plutellae* testées. Ceci permet de repérer les allèles les plus fréquents dans ces populations et de sélectionner les enzymes les plus variables.

Douze systèmes se sont avérés inexploitable. Soit aucune révélation n'a été obtenue, soit la révélation est trop faible pour être interprétable. Il serait possible de concentrer plus les extraits, ou de chercher de nouveaux systèmes de tampon pour améliorer la révélation, mais ceci réduit le nombre de caractérisations possibles sur un individu. D'autres systèmes s'avérant plus prometteurs, ces douze-là ont été abandonnés.

Sur les 13 autres systèmes, cinq étaient monomorphes sur les individus de *C. plutellae* testés. Il n'est pas exclu de ne pas avoir détecté dans ce cas des allèles rares, mais cette rareté les rend cependant peu utiles et on peut les négliger dans le cadre de cette première sélection.

Il reste donc 8 systèmes polymorphes, d'inégale valeur : Les quatre systèmes ME, PGDH, MPI et PEP Phe-Ala forment des "patterns" avec des allèles aisément différenciables ; nous les avons donc utilisés pour la caractérisation des populations (fig. 4-2). Les migrations sont reproductibles, avec des bandes fines (excepté la peptidase, qui forme des bandes floues restant lisibles cependant).

- ME et PGDH sont révélables sur un même gel et ont un aspect similaire, PGDH étant cependant plus rapide. Seuls deux allèles, notés S (Slow) et F (Fast), sont

observés pour chacune de ces enzymes. Les quelques femelles testées semblaient indiquer une structure monomérique de ces enzymes

- MPI présente trois allèles, notés V (Very slow), S (Slow) et F (Fast). Une ou deux bandes comigrantes plus rapides et moins intenses sont parfois observés et semblent correspondre à des produits de dégradation de l'enzyme.

- PEP Phe-Ala présente quatre allèles notés V, S, M (Medium) et F. Elle pourrait avoir une structure monomérique.

Les quatre autres systèmes polymorphes mis en évidence n'ont pas été inclus dans les premières analyses de caractérisation des populations, à cause de leur difficulté d'interprétation :

- PGM, enzyme à migration lente mais réactive, donne une série de trois bandes comigrantes, dont l'intensité relative varie entre bandes et entre individus, à déterminisme probablement polygénique (fig. 4-2). Une quatrième bande plus rapide, peu réactive, se remarque surtout chez les individus de la population béninoise. Dans ce système c'est en fait une impureté du glucose-1-phosphate utilisé comme réactif qui joue le rôle de substrat et l'utilisation de nouveaux flacons de produits n'a pas permis de retrouver exactement le même résultat.

- IDH, à migration très lente, ne peut servir à la caractérisation des populations car cette enzyme forme trop souvent des bandes floues, à fort polymorphisme dans la distance de migration et ininterprétables. Parfois des bandes plus nettes se sont formées mais ce résultat n'a pu être reproduit régulièrement. Des tentatives ultérieures sur gel d'amidon n'ont rien apporté de plus : cette enzyme semble être très massive, migrant très peu et il n'a pas été possible de séparer des allèles (fig. 4-3).

- La PEPTidase à Phe-Pro donne aussi des bandes très floues (toutes les peptidases testées présentent ce défaut), mais migrant à des vitesses différentes dans le locus lent, laissant supposer la présence de deux allèles, S et F. Le locus rapide, moins réactif, migre deux fois plus rapidement et sort déjà du gel quand le locus lent est à peine résolu.

- Les estérases pèchent par l'excès de résultats : ce système, le plus réactif de tous ceux testés, produit une dizaine de bandes visibles, très resserrées, d'intensité variable entre bandes et entre individus. Il n'est pas possible d'interpréter ce système complexe sur les petits gels d'acétate, où la distance de migration semble trop faible pour une résolution des bandes, et une autre technique d'électrophorèse, à base de gels d'amidon par exemple, s'impose alors. Cependant les autres enzymes testées ici sur acétate de cellulose ne se révèlent pas aussi facilement sur gels d'amidon car il faut une plus grande dilution des extraits enzymatiques et les colorations sont bien moins intenses.

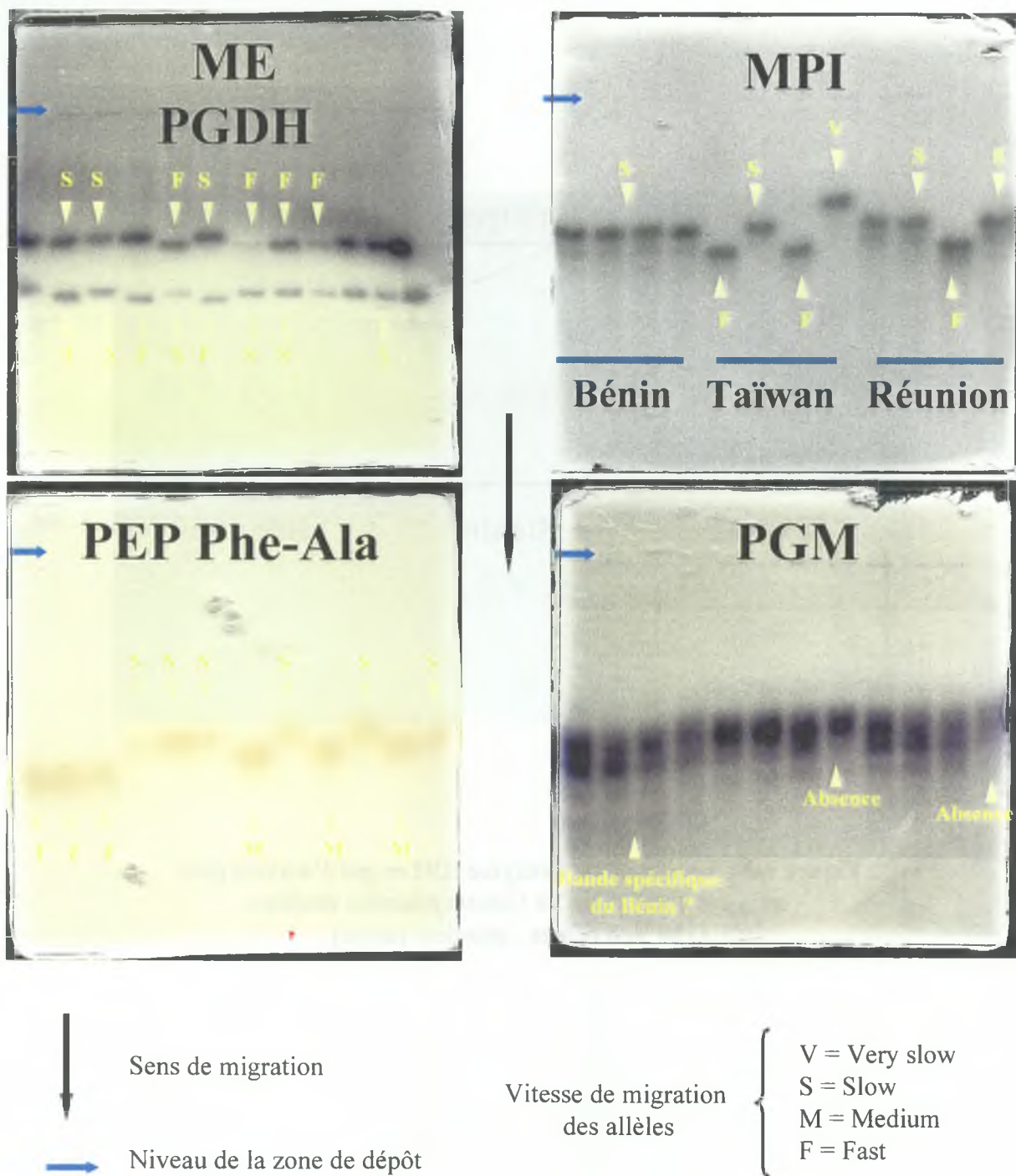


Figure 4-2 : Quelques résultats d'électrophorèse : exemples de révélations de gels d'acétate de cellulose pour les enzymes ME, PGDH, MPI, PEP Phe-Ala et PGM (190 V ; 25-40 min). (La disposition des individus des trois populations est la même pour tous les gels) (grandeur nature)

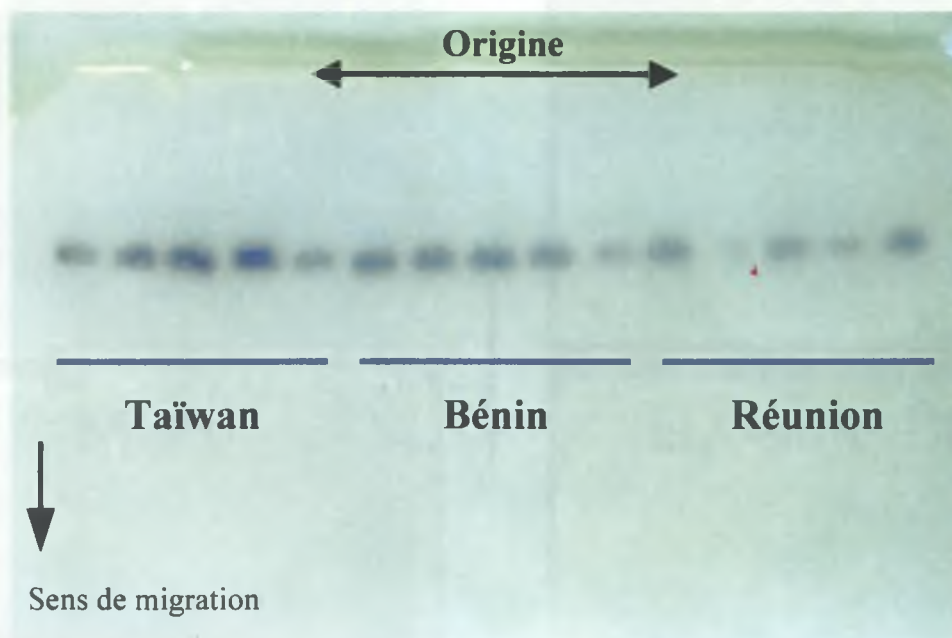


Figure 4-3 : Révélation de l'enzyme IDH en gel d'amidon pour trois des populations de *Cotesia plutellae* étudiées (150 V, 8 heures ; grandeur nature)

IV.4.2 - Caractérisation des populations

Des séries de *C. plutellae*, constituées essentiellement de mâles, sont testées pour les enzymes ME, PGDH, MPI et PEP Phe-Ala, équivalant à une trentaine d'individus diploïdes (soit une soixantaine de mâles) par population. Les fréquences alléliques sont ensuite calculées pour les cinq populations sur les quatre systèmes. Notons que les calculs sont parfois faits sur moins de 30 individus car certains dépôts, sur les bords des gels essentiellement, sont inutilisables. Cependant il peut y avoir plus de 60 bandes alléliques disponibles pour le calcul car quelques femelles diploïdes ont été intégrées aux électrophorèses en fonction des échantillons disponibles (tableaux en annexe 2).

IV.4.3 - Analyse statistique

On observe une grande diversité des fréquences alléliques, des valeurs inverses étant même rencontrées dans le cas de ME et de PGDH d'une population à l'autre (tableau 4-2).

Ces valeurs de fréquences alléliques sont soumises à une analyse par le logiciel F-Stat, par paires de populations et sur les trois populations, pour vérifier s'il existe des différences significatives entre les populations (voir annexe 2).

Les valeurs de différenciation génétique entre populations obtenues sont regroupées dans le tableau 4-3, une représentation graphique étant présentée dans la figure 4-4.

On observe une différenciation génétique importante entre les populations, surtout pour celle du Bénin qui s'avère très distincte de toutes les autres. *Cotesia plutellae* de la Réunion occupe aussi une position bien différenciée, tandis qu'à l'opposé la population sud-africaine testée et celle de Hong-Kong ne sont pas distinguables d'un point de vue statistique.

Cette différenciation est d'autant plus significative que l'échantillonnage utilisé était réduit : il est basé sur seulement 4 systèmes enzymatiques polymorphes et sur une soixantaine d'individus haploïdes pour chaque population, alors qu'on considère que l'analyse d'une quantité double de systèmes enzymatiques polymorphes est préférable, pour un même nombre d'individus (de Stordeur, comm. pers.). Un facteur ayant permis la réduction du nombre d'individus nécessaires est probablement le fait que chaque individu a pu être testé pour les quatre systèmes utilisés dans ces analyses, et non pas un individu différent à chaque fois comme les petites dimensions de *C. plutellae* auraient pu y contraindre.

Tableau 4-2 : Fréquences alléliques dans les systèmes et populations étudiés

Fréquences alléliques dans les populations de <i>C. plutellae</i> (%)						
Enzyme	Allèle	Bénin	Réunion	Taiwan	Af. Sud	HongKong
ME	S	35	80	48	2,5	25
	F	65	20	52	97,5	75
PGDH	S	85	20	30	12,5	10
	F	15	80	70	87,5	90
MPI	V	0	0	8	0	0
	S	100	83	78	100	100
	F	0	17	14	0	0
	V	0	0	5	0	0
PEP Phe-Ala	S	68	56	79	97,5	92,5
	M	0	18	9	2,5	7,5
	F	32	26	7	0	0

Tableau 4-3 : Différenciation génétique des populations de *Cotesia plutellae* (calcul du Fst)

	HongKong	Af. du Sud	Réunion	Taiwan	Bénin
Bénin	0,503**	0,452**	0,372**	0,182**	-
Taiwan	0,088**	0,065*	0,092**	-	
Réunion	0,289**	0,268**	-		
Af. du Sud	0,014 NS	-			
HongKong	-				

** : $p < 0,001$; * : $p < 0,01$

Le calcul simultané sur les cinq populations donne un Fst de 0,211 ($p < 0,001$)

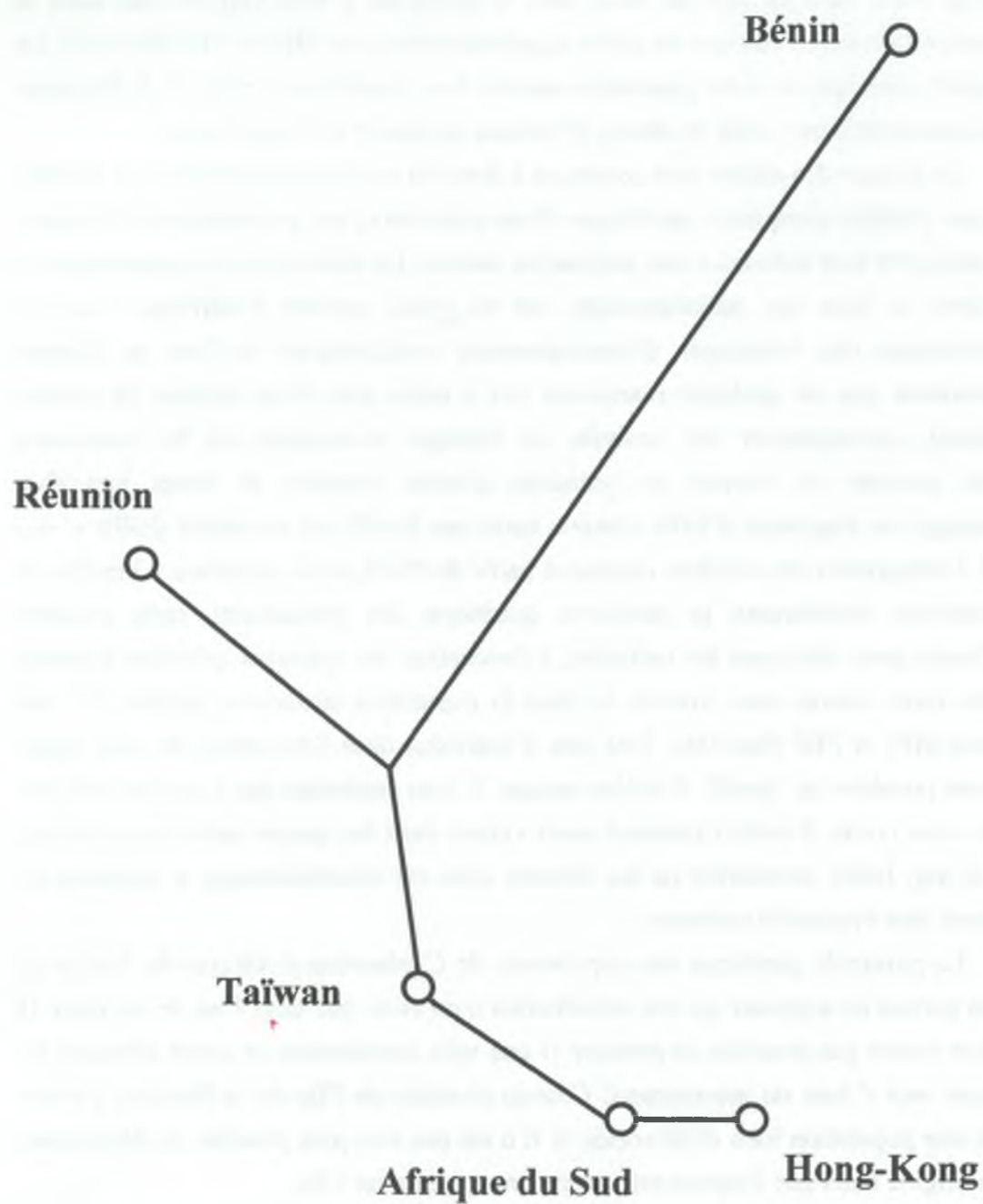


Figure 4-4 : Arborescence représentant la distance génétique entre les cinq populations de *Cotesia plutellae*, produite par le logiciel DARwin3.5 à partir des résultats du tableau 4-3.

Le nombre total d'allèles observés varie dans chaque population : sept allèles sont détectés dans les populations béninoise, sud-africaine et hong-kongaise de *C. plutellae*, neuf dans la population réunionnaise (deux allèles au lieu d'un pour l'enzyme MPI, trois au lieu de deux pour la peptidase à Phe-Ala) et onze dans la population taïwanaise (encore un allèle supplémentaire pour MPI et PEP Phe-Ala). La variabilité génétique de cette population semble donc supérieure à celle de la Réunion, elle-même supérieure à celle du Bénin, d'Afrique du Sud et de Hong-Kong.

La plupart des allèles sont communs à deux ou aux trois populations : il n'existe donc pas d'allèles marqueurs spécifiques d'une population, qui permettraient d'attribuer sans ambiguïté tout individu à une population donnée. La distinction des populations ne peut alors se faire que statistiquement, sur un grand nombre d'individus. Ceci est caractéristique des techniques d'électrophorèses enzymatiques où l'on ne dispose généralement que de quelques marqueurs (ici à peine plus d'une dizaine de bandes alléliques), contrairement aux analyses de biologie moléculaire où les marqueurs obtenus peuvent se compter en centaines d'unités (nombre de bases lors d'un séquençage, ou fragments d'ADN obtenus après des RAPD par exemple) (Hillis *et al.*, 1996). L'intégration des résultats obtenus à partir de PGM, de la peptidase à Phe-Pro et des estérases améliorerait la résolution génétique des populations, mais resterait insuffisante pour distinguer les individus, à l'exception des quelques individus porteurs d'allèles rares comme ceux trouvés ici dans la population taïwanaise (allèles "V" des enzymes MPI et PEP Phe-Ala). Très peu d'individus dans l'ensemble de ceux testés s'avèrent posséder un "profil" d'allèles unique. Il n'est cependant pas à exclure que ces allèles rares (voire d'autres) puissent aussi exister dans les quatre autres populations, mais la trop faible probabilité de les détecter dans cet échantillonnage a empêché de confirmer leur éventuelle existence.

La proximité génétique des populations de *C. plutellae* d'Afrique du Sud et de Taïwan permet de supposer qu'une introduction a pu avoir lieu dans l'un de ces pays. Il n'est par contre pas possible de préciser si une telle introduction se serait déroulée de l'Afrique vers l'Asie ou inversement. *Cotesia plutellae* de l'île de la Réunion s'avère former une population bien différenciée et il n'est pas non plus possible de déterminer ici son origine alors que l'espèce est récemment apparue sur l'île.

Un certain nombre de vérifications complémentaires seront à effectuer. Dans un premier temps, il serait intéressant de tester biochimiquement quelques autres populations pour mesurer d'autres distances génétiques. D'autres populations d'autres zones d'Afrique du Sud seraient ainsi à tester, car l'espèce y est implantée depuis longtemps et est assez isolée génétiquement, y compris des populations des pays voisins (Smith, comm. pers.), et les résultats observés sur cette population de Prétoria ne seront peut-être pas retrouvés ailleurs.

En fait, de nouvelles analyses pourraient s'intégrer dans un projet plus global de création d'une phylogénie des populations mondiales de *C. plutellae*. De nombreuses populations actuelles proviennent d'introductions volontaires et il serait intéressant de calculer leur divergence génétique à partir des souches d'origine (Pays-Bas et Inde pour toutes les introductions dans les Caraïbes, Taïwan pour beaucoup d'autres cas). Pour d'autres populations dont l'origine est inconnue (introduction volontaire non documentée ou sans suivi ultérieur, ou introductions accidentelles), la recherche de marqueurs spécifiques de populations, à l'aide de techniques de biologie moléculaire, pourrait apporter des réponses. Dans ce domaine, les interrogations les plus importantes concernent :

- l'origine des populations de *C. plutellae* d'Afrique du Sud : Kfir (1998) a émis l'hypothèse qu'il s'agit de la zone naturelle d'origine de *P. xylostella*, ce qui laisse supposer que les parasitoïdes existant là-bas ont dû y apparaître aussi. Dans ce cas c'est la population de Hong-Kong qui aurait été introduite d'Afrique.

- l'origine de la population de Taïwan, que Talekar *et al.* (1992) considèrent comme native de l'île, bien qu'il n'y soit connu que depuis les années 60 (alors que *P. xylostella* y est signalée depuis 1910).

- l'origine de *C. plutellae* de Brasilia : dérive-t-il de l'introduction de 1972 signalée par Cock (1985) et dont le résultat final reste inconnu, auquel cas il aurait une origine caraïbe (de Trinidad plus exactement) et indirectement un génotype indo-hollandais puisque les populations caraïbes elles-mêmes en dérivent ? Ou bien est-il venu par une autre voie ?

La question se pose aussi pour les populations nord-américaines, une introduction ayant été signalée au Missouri en 1978. Même chose encore pour les populations est- et ouest-africaines pour lesquelles aucune information sur l'origine possible ne semble exister.

CHAPITRE V

Variabilité génétique : Le polydnavirus symbiote de *Cotesia plutellae*

V.1 - Introduction : immunité des insectes et parades des parasitoïdes

Bien que leur système immunitaire diffère fortement de celui des Vertébrés (notamment par l'absence d'anticorps), celui dont disposent les insectes est très efficace, capable d'éliminer les corps étrangers pénétrant dans leur organisme, dont les œufs et les larves des parasitoïdes (Salt, 1963 ; Strand & Pech, 1995).

Selon la taille du corps étranger, il y aura défense par phagocytose ou par nodulation (pour des bactéries) ou un englobement de l'objet par les cellules sanguines (hémocytes) dédiées à la défense immunitaire. Un premier groupe d'entre elles, les granulocytes, vient adhérer à la surface de l'intrus, en formant des couches qui l'étouffent et l'immobilisent : c'est l'**encapsulation**. Un second groupe, les plasmatocytes, sécrète de la mélanine (par l'intermédiaire de la cascade enzymatique phénoloxydase), qui renforce et durcit ces couches cellulaires, avec libération concomitante de radicaux libres cytotoxiques : c'est la **mélanisation** (Strand & Pech, 1995). Cet ensemble forme une capsule noirâtre, parfois visible par transparence dans le corps de l'insecte (Carton *et al.*, 1991), montrant l'efficacité de ce mécanisme de défense. Notons que l'encapsulation est une réponse immunitaire cellulaire, tandis que la mélanisation est une réponse immunitaire humorale, qui comprend aussi la sécrétion de divers peptides à rôle surtout antibactérien (Bowman & Hultmark, 1987).

Malgré ces défenses, les parasitoïdes réussissent à se développer, souvent avec un taux de succès élevé (Rotherham, 1967 ; Edson *et al.*, 1981). Ils forment même l'un des groupes animaux les plus diversifiés qui soient, preuve du succès de leur stratégie : il existe probablement plus de 100 000 espèces uniquement dans le taxon des Ichneumonoidea (Ichneumonidae et Braconidae) et d'autres groupes d'Hyménoptères possèdent aussi des espèces parasitoïdes.

Ils ont pour ce faire développé des mécanismes d'évitement ou de contrôle du système immunitaire de leur hôte au cours de leur coévolution avec celui-ci. Plusieurs stratégies sont apparues :

- Techniques passives (**immunoévasion**) : le parasitoïde évite d'être détecté par le système immunitaire de son hôte.

- 1) Ponte dans des zones corporelles de l'hôte inaccessibles aux cellules immunitaires (ganglions nerveux par ex.) ou ponte dans des stades "permissifs", à immunité peu développée (œufs, jeunes larves) (Salt, 1968).

- 2) Mimétisme antigénique : l'oeuf ou la larve du parasitoïde se couvrent de protéines imitant celles de l'hôte, et les cellules immunitaires reconnaissent alors le parasitoïde comme un élément du "soi", qui n'est donc pas attaqué. Cette stratégie est connue chez des Ichneumonidés et Braconidés sans polydnavirus, comme

Venturia canescens Gravenhorst (Hym. : Ichneumonidae), parasitoïde de la pyrale de la farine *Ephestia kuhniella* (Zeller) (Lep. : Pyralidae). Le chorion de ses œufs est protégé par une couche de VLP (Virus-Like Particles, particules à aspect de virus mais dans lesquelles la présence d'acides nucléiques n'est pas démontrée) qui empêchent l'encapsulation (Rotheram, 1973a, 1973b ; Norton & Vinson ; 1977 ; Davies & Vinson, 1986). Ce phénomène a aussi été observé chez des espèces à polydnavirus, des protéines ovariennes servant alors de couche protectrice (Shelby & Webb, 1999).

- Techniques actives (**immunosuppression**) : le parasitoïde neutralise le système immunitaire de l'hôte de façon à autoriser le libre développement de sa descendance sans risque d'encapsulation.

- 1) Libération de tératocytes. Ces cellules originaires d'un tissu extra-embryonnaire présent dans l'oeuf semblent avoir pour rôle d'affaiblir le système immunitaire en épuisant ses réserves énergétiques (Salt, 1968 ; Vinson, 1970 ; Vinson ; 1971 ; Beckage, 1998b). Elles perturberaient aussi la synthèse protéique (Schepers *et al.*, 1998).

- 2) Injection de venin par la femelle de guêpe parasitoïde. Ce venin est chargé de protéines à rôle mal connu. Chez certains hyménoptères porteurs de polydnavirus (voir plus loin), le venin agit comme un synergiste puissant de ces virus (Soller & Lanzrein, 1996 ; Gupta & Ferkovich, 1998).

- 3) Des VLP sont connues chez *Leptopilina boulardi* (Barbotin, Carton & Kelner-Pillault) (Hym. : Figitidae : Eucoilinae), parasitoïde de la drosophile. Elles ont un rôle immunosuppresseur, à la différence de celles de *Venturia canescens*, et entraînent la destruction des lamellocytes, un autre type de cellules sanguines immunitaires (Rizki & Rizki, 1984 ; Rizki & Rizki, 1990 ; Russo *et al.*, 1996). D'autres VLP viennent aussi d'être découvertes chez *Microctonus aethiopoides* Loan (Hym. : Braconidae : Euphorinae), parasitoïde de charançons (Barratt *et al.*, 1999).

- 4) Chez certaines sous-familles d'Ichneumonidés et de Braconidés, la capacité d'immunodépression est liée à la possession d'un virus associé (Drezen *et al.*, 1999), spécifique à un tel point que l'association entre le virus et la guêpe est devenue une symbiose : le génome viral est intégré dans les chromosomes de la guêpe (Xu & Stoltz, 1991 ; Fleming & Summers, 1991 ; Gruber *et al.*, 1996 ; Savary *et al.*, 1997). Sa transmission est devenue uniquement verticale, le virus passant chez tous les membres de la génération suivante, mâles comme femelles, même si seules ces dernières le retransmettent (Fleming & Summers, 1986 ; Stoltz, 1990). C'est l'un des rares cas connus d'intégration virale dans un génome d'insecte (Drezen *et al.*, 1997).

La guêpe parasitoïde, de son côté, ne peut plus accomplir son cycle de développement sans l'aide du virus : les oeufs et larves injectés expérimentalement en l'absence du virus sont invariablement encapsulés et détruits. A l'opposé le virus purifié

injecté dans la chenille hôte induit une partie des effets physiologiques observés lors d'un parasitisme naturel, où l'oeuf du parasitoïde est introduit avec le virus et du venin (Edson *et al.*, 1981).

V.2 - Les polydnavirus

Ces virus si particuliers sont regroupés dans une famille relativement récente, les Polydnaviridae (Stoltz *et al.*, 1984 ; Brown, 1986). Ils sont appelés **Polydnavirus** (PDV en abrégé) à cause d'une caractéristique unique de cette famille : un génome multipartite composé de 10 à 40 cercles d'ADN bicaténaire. La masse unitaire de ces cercles s'échelonne de 2 000 à plus de 25 000 paires de base (pb), la masse totale du génome variant de 85 000 à plus de 300 000 pb (Krell & Stoltz, 1979 ; Krell *et al.*, 1982). Mais il s'agit seulement d'approximations car il est difficile de séparer les cercles viraux et d'en déterminer la masse et même le nombre exact (Shelby & Webb, 1999).

Les polydnavirus sont séparés en deux sous-familles bien distinctes, mais ayant en commun cette structure génomique particulière.

Les **Ichnovirus** n'existent que chez deux sous-familles d'Ichneumonidae. Ils possèdent une forme lenticulaire (dimensions 85 x 300 nm) et sont entourés d'une double membrane. Les cercles viraux des Ichnovirus sont en général de dimensions inférieures à ceux des Bracovirus (Stoltz & Whitfield, 1992).

Les **Bracovirus** sont inféodés aux sous-familles de Braconidés du complexe "microgastroïde", monophylétique. Toutes les espèces de ce complexe étudiées jusqu'à présent se sont révélées posséder des polydnavirus et selon Whitfield (1997) il est probable que l'ensemble des espèces du complexe microgastroïde en soient porteuses. Les espèces de ce complexe dériveraient d'un même ancêtre commun, déjà porteur de ce virus il y a 60 millions d'années et qui l'a transmis à l'ensemble du groupe (Whitfield, 1997).

Il y aurait en fait environ 30 000 espèces porteuses de polydnavirus, mais ces derniers n'ont été mis en évidence que chez une cinquantaine d'entre elles et étudiés en détail chez quelques-unes seulement (Shelby & Webb, 1999).

Si le virus est présent sous forme intégrée dans le génome de tous les individus du parasitoïde, la forme libre ne se présente que dans les ovaires et se concentre dans la région du calice (Hamm *et al.*, 1990). La réplication virale chez les Bracovirus s'effectue dans ce calice, dans des cellules qui obstruent ce qui deviendra la lumière des oviductes. Puis ces cellules productrices sont lysées et les particules virales sont libérées dans le fluide du calice, qui baigne alors la lumière des oviductes, maintenant dégagée, par où transitent les oeufs du parasitoïde (de Buron & Beckage, 1992).

Lors de l'oviposition, la guêpe injecte son ou ses œufs dans le corps de la chenille hôte, avec le fluide du calice chargé de virus ainsi que du venin qui potentialise des effets du PDV suivant les espèces (Kitano, 1982 ; Kitano, 1986 ; Tanaka, 1987 ; Tanaka & Vinson, 1991), ainsi que d'autres sécrétions des glandes accessoires (Guillot, 1972) et des protéines ovariennes. Les PDV vont alors infecter les cellules de l'hôte et s'y exprimer. Il est à noter que cette expression ne se réalise pas dans le même organisme que celui où s'effectue la réplication, ce qui est inhabituel pour un virus et peut faire douter de son appartenance au monde viral. Certains auteurs voient donc dans les PDV une création de la guêpe destinée à améliorer son succès reproducteur et non pas un virus associé dans une symbiose (Volkoff, 1999).

L'expression des PDV induit de multiples effets physiologiques, avec des variantes suivant le système hôte-parasitoïde considéré (Vinson & Iwantsch, 1980 ; Lavine & Beckage, 1995) (fig. 5-1). Globalement le métabolisme cellulaire se retrouve détourné au profit du parasitoïde qui croît sur les tissus et l'hémolymph de l'hôte et peut ainsi augmenter la quantité de ressources nutritives disponibles pour sa propre croissance (Jones, 1996).

Les modifications les plus importantes observées sont :

- 1 - *L'immunosuppression* : les hémocytes, cible principale des PDV, changent de forme et deviennent incapables d'adhérer aux corps étrangers injectés dans la chenille, y compris les œufs et larves de parasitoïdes (Strand & Pech, 1995 ; Lavine & Beckage, 1995). Il s'agit d'ailleurs des rares cas où l'on a pu mettre en évidence l'effet direct de protéines transcrites de l'ADN viral : elles désorganisent le cytosquelette des hémocytes, déclenchent l'apoptose de ces cellules ou inactivent l'encapsulation (Albrecht *et al.*, 1994 ; (Asgari *et al.*, 1997 ; Beckage, 1998a). On suppose que la majorité des transcrits viraux ont aussi un rôle immunosuppresseur mais il n'est pas mis directement en évidence. Les PDV restent extrêmement mal connus.

- 2 - *Arrêt du développement de l'hôte* : une chenille infectée par un PDV, sous forme purifiée ou lors d'un parasitisme naturel, ne peut plus se nymphoser même si elle ne contient pas de parasitoïde (Vinson, 1972 ; Sato, 1986 ; Soller & Lanzrein, 1996). Ce blocage du développement permet aux larves de parasitoïdes de compléter leur cycle quel que soit le stade de la chenille attaqué, même proche de la nymphose (Doucet & Cusson, 1996). L'arrêt du développement est lié à des altérations des taux hormonaux de la chenille, en particulier les hormones juvéniles comme les ecdystéroïdes (Shelby & Webb, 1997 ; Drezen, 1999).

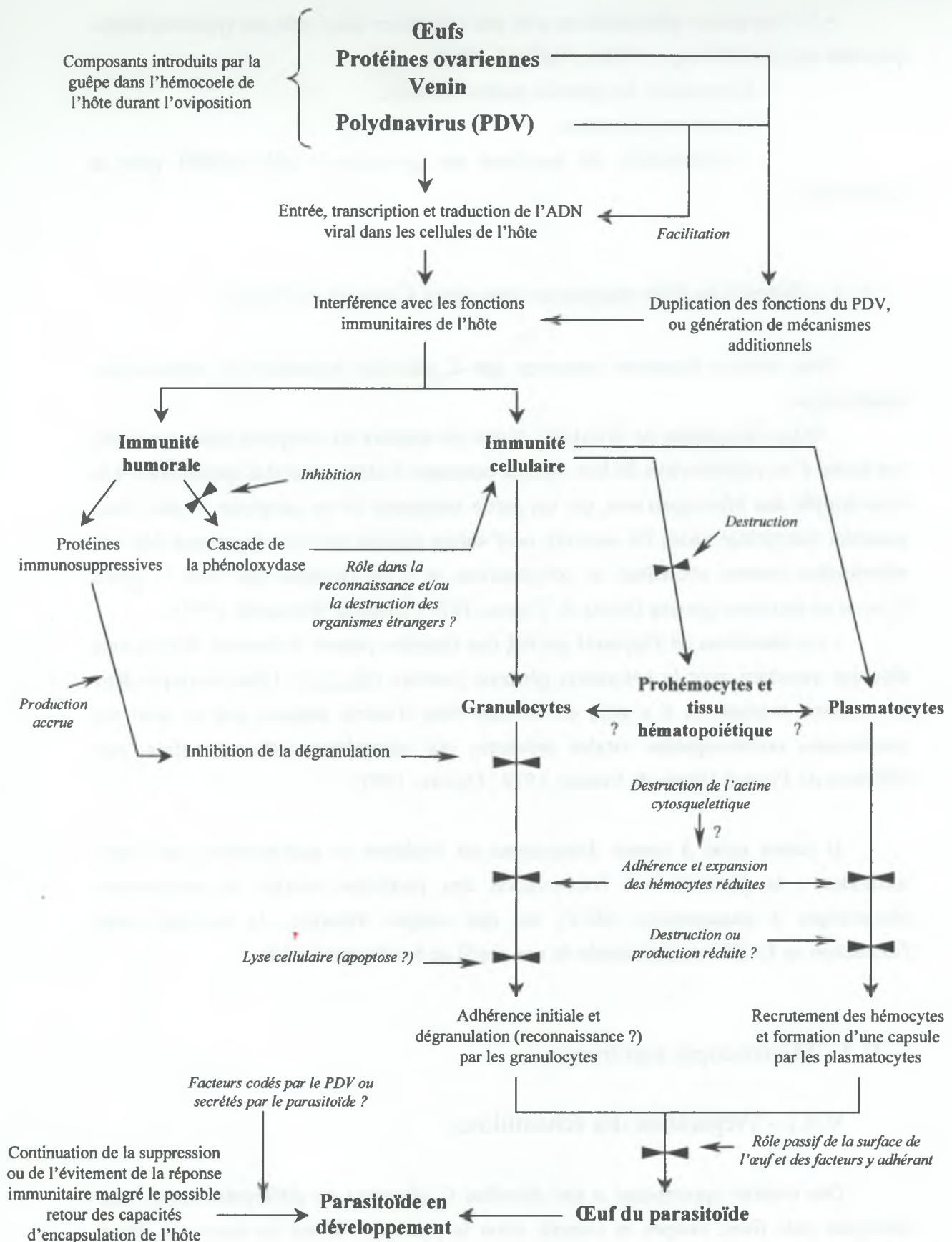


Figure 5-1 : Diagramme schématisant des points possibles de régulation du système immunitaire de l'hôte par le parasitoïde, le polydnavirus, les protéines ovariennes, le venin et autres facteurs. Adapté de Lavine & Beckage (1995) (fig. 9, p. 376).

• 3 - Les autres altérations ne sont pas constatées dans tous les systèmes hôtes-parasites étudiés (Beckage, 1998b ; Volkoff, 1999):

- Destruction des glandes prothoraciques ;
- Castration parasitaire ;
- Accumulation de protéines ou de sucres à rôle nutritif pour le parasitoïde.

V.3 - Détection d'un polydnavirus chez *Cotesia plutellae*

Deux indices laissaient suspecter que *C. plutellae* possédait un polydnavirus symbiotique :

- Selon l'hypothèse de Whitfield, toutes les espèces du complexe microgastroïde ont hérité d'un polydnavirus de leur ancêtre commun. *Cotesia plutellae* appartenant à la sous-famille des Microgastrinae, qui est partie intégrante de ce complexe, il doit donc posséder son propre virus. De surcroît, neuf autres espèces de *Cotesia* avaient déjà été répertoriées comme possédant un polydnavirus et il est probable que tout le genre *Cotesia* en soit donc porteur (Stoltz & Vinson, 1979 ; Stoltz & Whitfield, 1992).

- La dissection de l'appareil génital des femelles permet d'observer deux zones bleutées tranchant avec la coloration générale jaunâtre (fig. 2-3). Elles correspondent aux calices ovariens et il a déjà été montré chez d'autres espèces que ce sont les nombreuses nucléocapsides virales présentes qui engendrent cette coloration, par diffusion de Tyndall (Stoltz & Vinson, 1979 ; Quicke, 1997).

Il restait donc à mettre directement en évidence ce polydnavirus, par deux méthodes : la première est l'observation des particules virales au microscope électronique à transmission (MET) sur des coupes d'ovaires, la seconde étant l'extraction de l'ADN viral et l'étude de son profil de bandes par RFLP.

V.4 - Microscopie électronique

V.4.1 – Préparation des échantillons

Des ovaires appartenant à des femelles *C. plutellae* de différents stades sont disséqués puis fixés, coupés et colorés selon le protocole donné en annexe 3. Pour vérifier l'évolution de la charge virale, on prépare trois types de matériel :

- femelles âgées d'une semaine, présumées avoir une charge virale maximale.
- femelles fraîchement émergées, pas encore prêtes à l'oviposition.

- nymphes âgées de 2 à 3 jours, et femelles non encore émergées (4 jours de développement nymphal), extraites de leur cocon. Pour les nymphes, la partie postérieure de l'abdomen est traitée en entier. Les nymphes plus jeunes et les larves ne sont pas utilisées car leur sexe n'est pas encore déterminable.

Sont ajoutés à cette série d'échantillons des ovaires d'un autre parasitoïde nord-américain de *P. xylostella*, *Microplitis plutellae* Muesebeck (Hym. : Braconidae : Microgastrinae) pour confirmer la présence de polydnavirus chez cette autre espèce.

L'observation des coupes obtenues se fait ensuite sous des grossissements compris entre 5 000 et 40 000 fois.

V.4.2 - Résultats

V.4.2.1 - *Cotesia plutellae*

Il n'a pas été possible d'obtenir des résultats sur les nymphes, car les agents fixateurs pénètrent difficilement les tissus et il a été impossible d'obtenir des coupes microscopiques correctes à partir de ces échantillons. Les autres échantillons se sont avérés par contre tous contenir des polydnavirus en grandes quantités, et ce dès avant l'émergence : la réplication virale se fait donc très tôt dans le cycle de développement de l'insecte comme cela a été observé chez *Cotesia congregata* (de Buron & Beckage, 1992). Le polydnavirus apparaît sous forme libre dans les ovaires de cette espèce durant la nymphose, l'excision de cercles viraux ayant été mise en évidence dès ce stade (Savary *et al.*, 1997).

La première photo, à faible grossissement (fig. 5-2), présente la structure transversale du calice et la position des polydnavirus, entourant l'oeuf dans le fluide du calice, mais sans adhérer à celui-ci et former une couche protectrice comme les VLP de *Venturia canescens* (Rotherham, 1973a, 1973b). Les microvillosités de l'exochorion restent dégagées de toute particule virale.

A grossissement plus important, on distingue mieux la structure des particules virales, ou polydnavirions (fig. 5-3). D'aspect général, ils ressemblent aux baculovirus, autres virus (pathogènes) d'insectes, avec lesquels ils ont longtemps été confondus. Par contre leur structure fine diffère profondément : on observe de nombreuses nucléocapsides, cylindriques, et de longueur très variable, ce qui est typique des bracovirus. Ces nucléocapsides varient aussi en nombre au sein d'un virion. En fait le génome des polydnavirus est tellement important qu'une nucléocapside seule ne peut le contenir en totalité : chacune ne renferme qu'un seul cercle viral et les dimensions des nucléocapsides sont en relation avec la longueur du cercle viral encapsidé (Stoltz & Vinson, 1979 ; Albrecht *et al.*, 1994). Même un polydnavirion entier ne contient pas l'ensemble du génome viral : il est reconstitué de manière statistique, par le grand

nombre de virions qui sont injectés dans la chenille hôte et qui représentent en moyenne la structure génomique typique du polydnavirus de *C. plutellae*.

Les PDV disposent d'une "queue" (insert de la figure 5-3). C'est une expansion de leur enveloppe, mieux visible en coloration négative, qui pourrait jouer un rôle dans la fixation sur les cellules de la chenille (Stoltz & Vinson, 1977).

V.4.2.2 - *Microplitis plutellae*

Il dispose lui aussi d'un polydnavirus (fig. 5-4), mais en quantités plus faibles que *C. plutellae*. Ses ovaires sont plus petits et plus pâles, et la quantité d'ADN extraite s'avère plus faible (voir plus loin). On observe aussi des nucléocapsides cylindriques de taille variable, mais à raison d'une nucléocapside par particule virale comme cela a été observé chez d'autres espèces de *Microplitis* (Stoltz *et al.*, 1976).

V.5 - Le polymorphisme du polydnavirus chez *C. plutellae*

V.5.1 - Introduction

Bien que fort peu d'études se soient attachées à cet aspect, il a été montré non seulement que les polydnavirus diffèrent fortement d'une espèce de Braconidé à l'autre (Stoltz & Whitfield, 1992), mais aussi qu'il existe une certaine variabilité inter- voire intra- populationnelle chez ces virus (Stoltz *et al.*, 1981 ; Stoltz & Xu, 1990). Il était donc intéressant de vérifier si une telle variabilité existait aussi chez *C. plutellae* car l'existence d'un virus symbiotique permet en effet de disposer d'un marqueur très spécifique, original et susceptible de constituer un moyen de caractériser les populations de Braconidés "microgastroïdes".

L'intérêt potentiel des PDV en tant que marqueurs génétiques provient des grandes dimensions de leur génome viral. Il est de ce fait susceptible de subir des mutations en nombre important. Sous sa forme libre, il peut être extrait et purifié aisément. Plus encore, les gènes impliqués dans le parasitisme, et soumis par là-même à une forte pression de sélection, ne constituent qu'une fraction du génome. Le reste de l'ADN semble former un marqueur neutre qui affiche un polymorphisme plus important (Drezen, comm. pers.).

Puisque ce génome viral est de taille importante, il a une probabilité plus élevée de subir des mutations et on peut ainsi espérer détecter plus aisément certaines d'entre elles pour analyser la variabilité virale. Notre méthode d'étude de cette variabilité s'est portée sur la technique de la RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), méthode simple d'emploi et susceptible de fournir de nombreuses informations

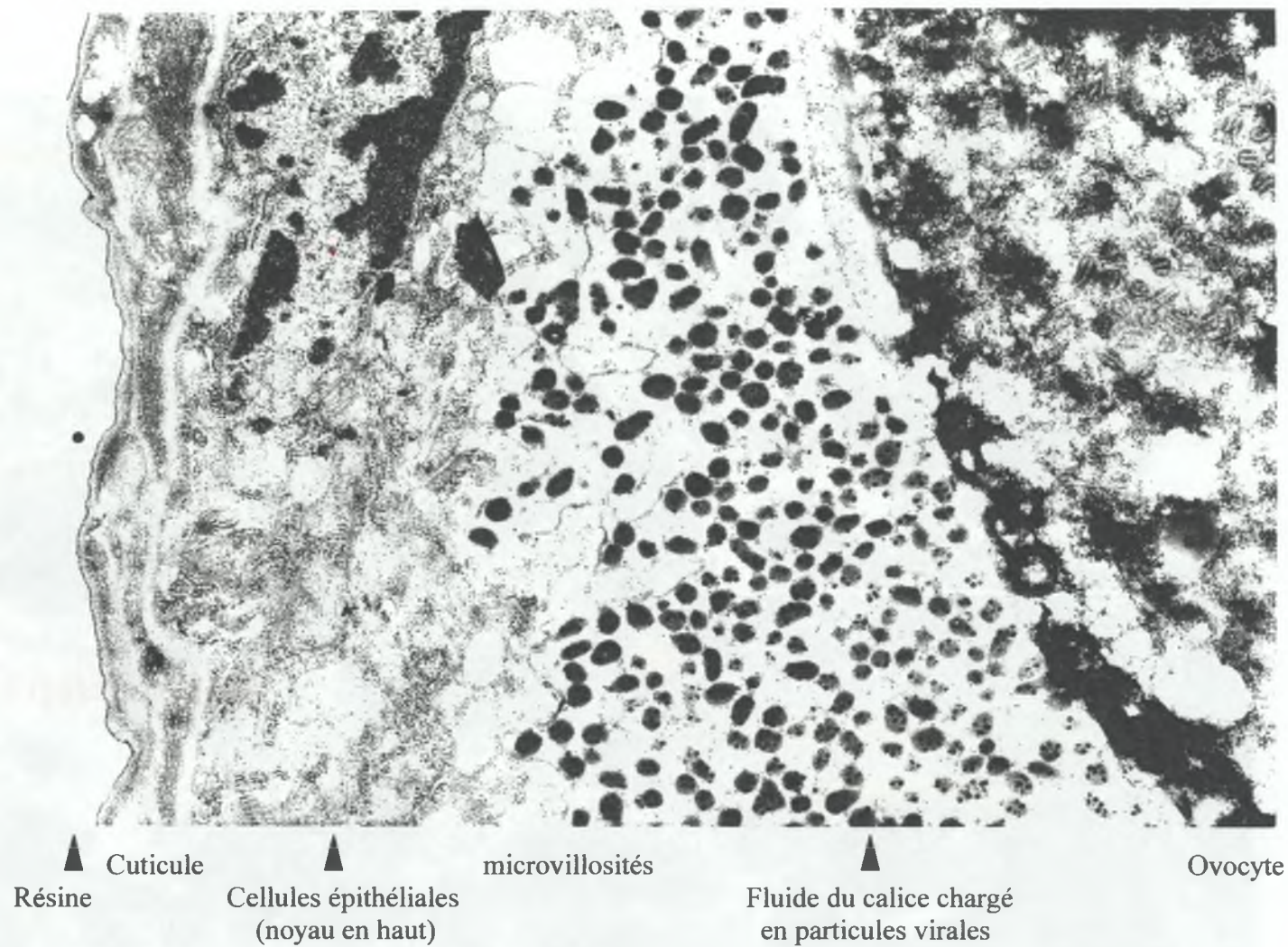


Figure 5-2 : coupe transversale d'un calice ovarien de *Cotesia plutellae* et localisation des polydnavirus (x 10 000)

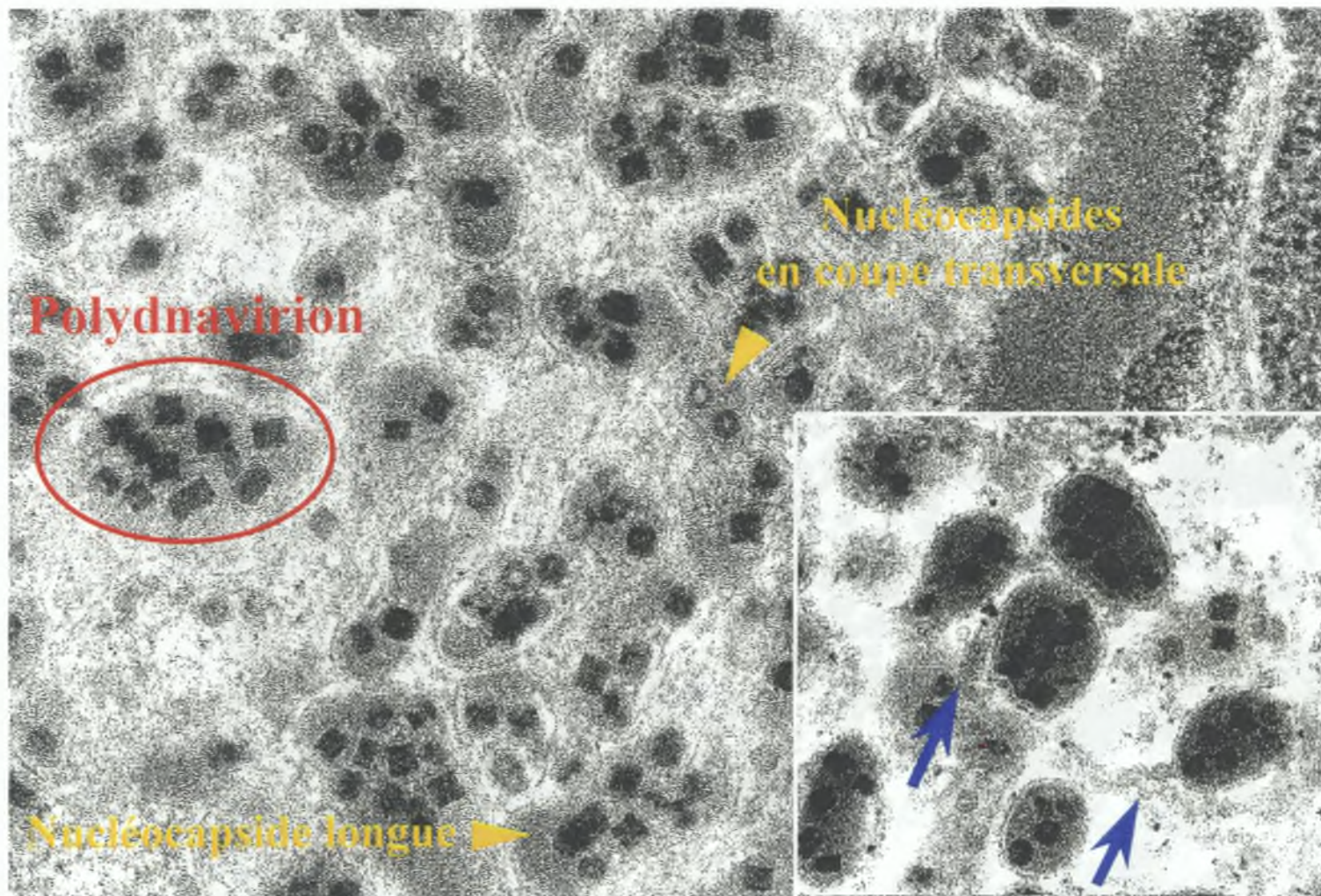


Figure 5-3 : Polydnavirus de *Cotesia plutellae* (MET, grossissement x 40 000).
Insert : autre image montrant la “queue” visible sur certains virions (x 30 000).

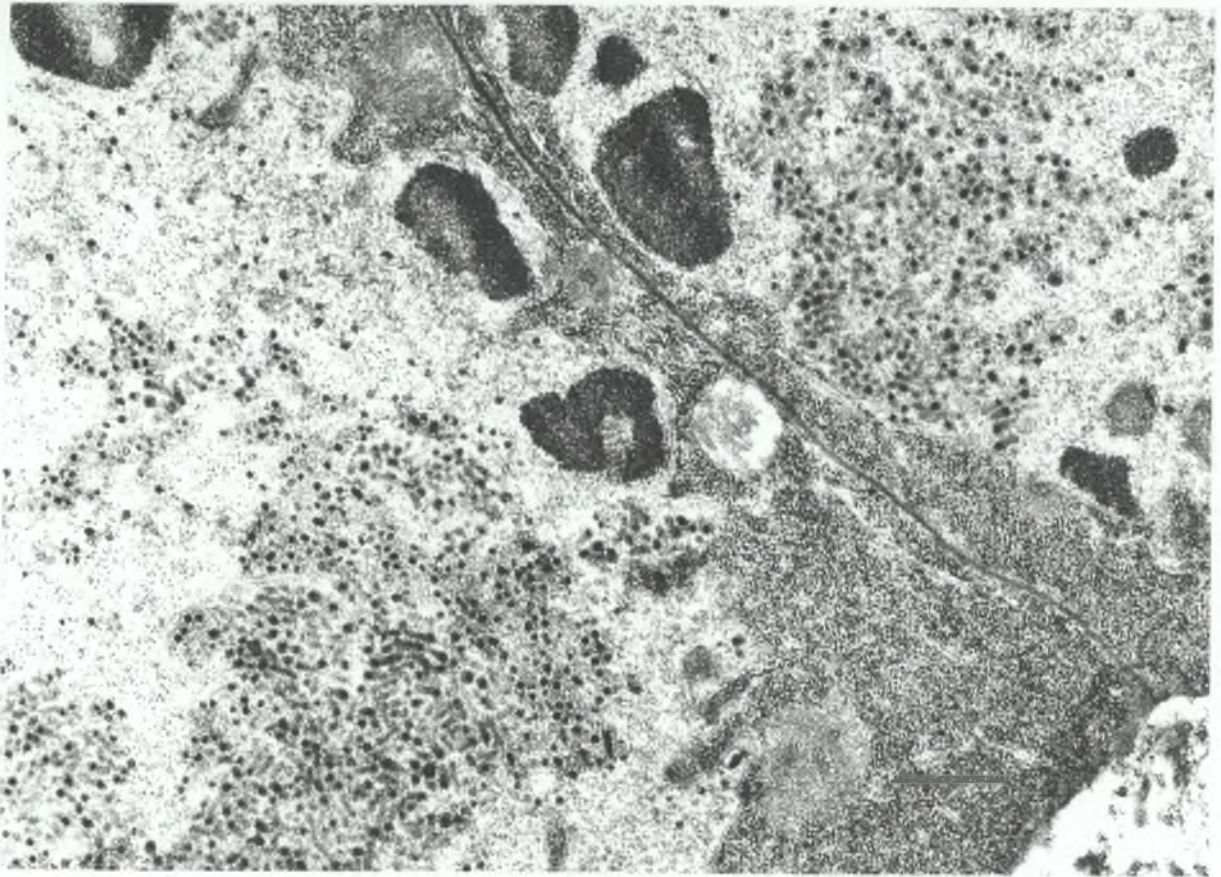


Figure 5-4a : Polydnavirus de *Microplitis plutellae* (gross. x 10 000)

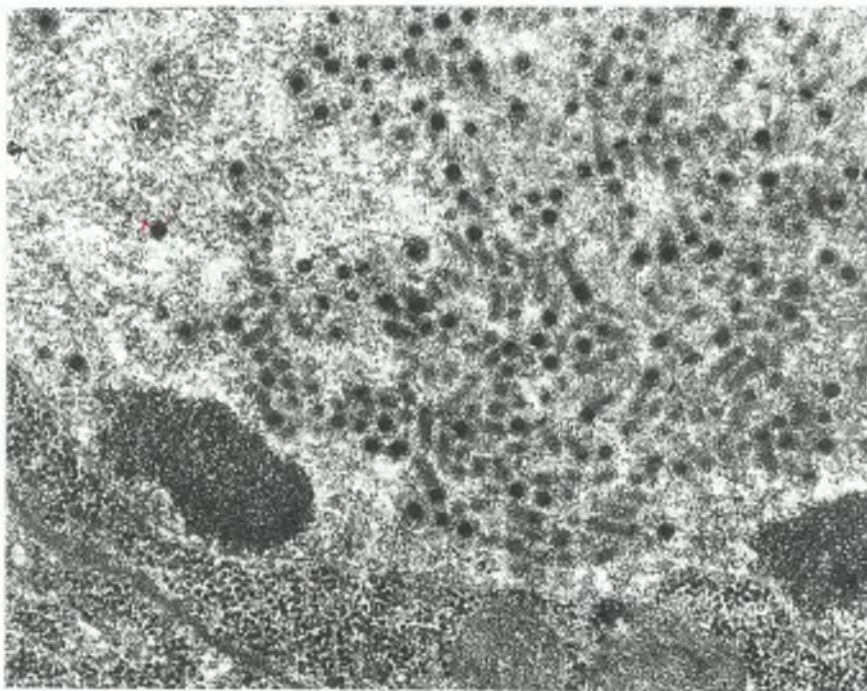


Figure 5-4b : Détail des particules virales (x 20 000)

généétiques sous la forme de fragments de restriction. La RFLP consiste à couper l'ADN en multiples fragments à l'aide d'enzymes de restriction (ou endonucléases), protéines qui clivent les chaînes d'ADN quand elles reconnaissent une séquence particulière de bases (généralement 4, 6 ou 8 paires de bases), qui est ainsi un "site de coupure" pour cette enzyme. Les fragments sont séparables en fonction de leur taille par une électrophorèse (sur gel d'agarose ici). Si une mutation se produit sur un site de coupure, l'enzyme ne le reconnaît plus et ne coupe pas à cet endroit, et on obtient un long fragment d'ADN, migrant lentement, au lieu de deux petits migrant plus rapidement. On peut ainsi repérer directement des mutations de l'ADN si elles se produisent au niveau d'un site de coupure d'une enzyme de restriction.

La technique doit cependant être utilisée ici dans des conditions particulières, à savoir une digestion directe de l'ADN viral extrait des ovaires. Il n'est en effet pas possible de réaliser une PCR (Polymerase Chain Reaction) pour amplifier la quantité d'ADN disponible à partir d'un génome dont on suppose les dimensions supérieures à 150 000 paires de base, bien trop long pour que l'on puisse employer cette technique sur l'intégralité de l'ADN. De plus on ne connaît pas de paires d'amorces susceptibles d'amplifier des fractions de ce génome chez *C. plutellae*.

En fonction des mutations détectées par les enzymes de restriction au cours de la RFLP, on obtiendra des gels d'électrophorèse porteurs d'un certain nombre de bandes, fragments du génome viral dont le nombre et la position varient selon le nombre de coupures qu'auront réalisées les enzymes de restriction et les mutations qui affectent ces sites : ce sont des profils de restriction qu'il faut ensuite analyser. Il s'agit alors de repérer toutes les bandes visibles, surtout celles qui diffèrent d'un échantillon à l'autre et de coder ces informations sous une forme exploitable informatiquement. Ainsi, tout comme pour les allèles enzymatiques, mais avec un nombre de marqueurs plus élevé, il devient possible de calculer des distances génétiques entre les populations.

Si la manipulation s'avère effectivement réalisable jusqu'à ce stade, il pourrait être possible de valider ce marqueur par comparaison avec les calculs de différenciation génétique déjà effectués par électrophorèse isoenzymatique sur des populations de *C. plutellae* du Bénin, de l'île de la Réunion et de Taiwan, car l'ADN viral est extrait d'individus appartenant aux mêmes populations.

V.5.2 - Extraction de l'ADN viral et visualisation

Le protocole d'extraction de l'ADN à partir des ovaires disséqués est détaillé en annexe 4. Les volumes de réactifs utilisés permettent de réaliser tout le processus dans un volume de 1,5 ml, soit celui d'un microtube, avec un seul transfert.

On ajoute à la resuspension finale d'ADN 1 µl d'enzyme de restriction et 1 µl du tampon 10X approprié et on laisse incuber une nuit à 37 °C. Puis les échantillons sont chargés sur des gels à 0,7 % d'agarose. La migration dure 24 h sous une tension de 45 V avec un tampon TAE 1X.

Différentes enzymes de restriction sont testées afin de sélectionner celles qui reconnaîtront suffisamment de sites de coupure. On sait en effet que le génome des polydnavirus est constitué de cercles d'ADN pouvant avoir une taille supérieure à 20 000 pb, or des fragments d'ADN de telles dimensions migrent très lentement. Il n'est donc pas possible de déterminer leur longueur de façon suffisamment précise pour estimer correctement le nombre total de bases du génome viral. C'est pourquoi il est souhaitable de pouvoir disposer d'enzymes fragmentant les plus grands cercles viraux pour obtenir des bandes de dimensions inférieures à 20 000 pb au moins. Dans ce cas nous pouvons estimer correctement leur dimension par comparaison avec un marqueur (λ Hind III dans notre cas) et en déduire celle du polydnavirus, complet. Cependant seules des enzymes reconnaissant des séquences de six bases consécutives ont été utilisées. Avec des endonucléases moins spécifiques, ne reconnaissant que des séquences de quatre bases nous aurions obtenu beaucoup trop de fragments pour les résoudre correctement sur un gel d'agarose et pouvoir les analyser.

La visualisation des fragments d'ADN viral ayant migré après l'électrophorèse est réalisée à l'aide d'une coloration par des colorants intercalants fluorescents. Le Bromure d'Ethidium (ou BET) a été utilisé ainsi que le GelStar™, leurs caractéristiques et les protocoles de coloration étant détaillés en annexe 4 également.

L'autoradiographie a également été utilisée dans certains cas pour renforcer la précision des résultats : elle est plus sensible et permet d'obtenir une image plus contrastée, ce qui permet de mieux observer les petits fragments à migration rapide et les bandes contenant très peu d'ADN. Cependant elle présente des contraintes d'utilisation plus lourdes que celles liées aux colorants à ADN, notamment à cause de l'emploi de substances radioactives.

V.5.3 - Résultats

Le protocole d'extraction utilisé permet d'obtenir un ADN viral de pureté estimée à 80 %. Le bruit de fond lié à l'ADN génomique présent dans les ovaires est faible et n'empêche pas la visualisation des bandes d'origine virale (fig. 5-5). Les bandes les plus intenses restent visibles même si on extrait l'ADN à partir d'un individu entier (fig. 5-5).

Cependant la quantité d'ADN viral portée par une seule femelle est réduite : nous l'estimons à quelques dizaines de nanogrammes, ce qui est similaire à ce qui est observé chez *Cotesia congregata* (Beckage et al., 1994). Si les bandes d'ADN viral

appartenant à un groupe d'individus (trois à cinq dans les premières expériences) sont visibles à l'aide d'une coloration au BET, ceci n'est plus possible pour un individu isolé, d'autant plus que les pertes sont proportionnellement plus élevées. Ceci nous a conduit à rechercher une méthode plus sensible de visualisation de l'ADN, en l'occurrence la coloration par le GelStar™. Décrit par son fabricant comme le plus puissant colorant actuellement sur le marché, il s'est avéré effectivement plus de dix fois plus sensible que le BET et nous a ainsi permis d'étudier l'ADN viral extrait d'une seule femelle de *C. plutellae*.

L'espèce *Microplitis plutellae* semble posséder 10 à 20 fois moins d'ADN viral que *C. plutellae* : nous n'avons pu obtenir de révélation nette après RFLP et coloration par le GelStar même à partir de l'ADN extrait de lots d'ovaires de 20 individus. Ceci laisse supposer que la quantité totale d'ADN viral chez cette espèce est de l'ordre du nanogramme et nous n'avons pu poursuivre l'étude de ce second polydnavirus, pas assez abondant pour être visualisable sur nos gels.

Quatorze enzymes de restriction ont été testées sur l'ADN du polydnavirus de *C. plutellae* (que l'on peut abréger en CpPDV), mais elles n'ont pas toutes la même efficacité (tableau 5-1).

Nos résultats montrent que la meilleure enzyme testée ici est Eco RI, suivie de Eco RV et de Hind III. L'enzyme Dra I, qui clive l'ADN quand elle reconnaît la séquence AAATTT semble couper un si grand nombre de sites de restriction qu'il ne reste plus aucune bande discernable : il est donc possible que le génome du CpPDV contienne de nombreuses séquences répétées contenant la structure AAATTT. Le signe "-" dans le tableau ne signifie pas que les enzymes concernées ne reconnaissent aucun site de coupure, mais en fait qu'elles génèrent des gros fragments, laissant peut-être des cercles viraux entiers intacts (cas de l'enzyme Xho I par exemple, fig. 5-6) et on perd alors une partie de l'information potentiellement exploitable à cause de la résolution insuffisante des fragments d'ADN sur les gels.

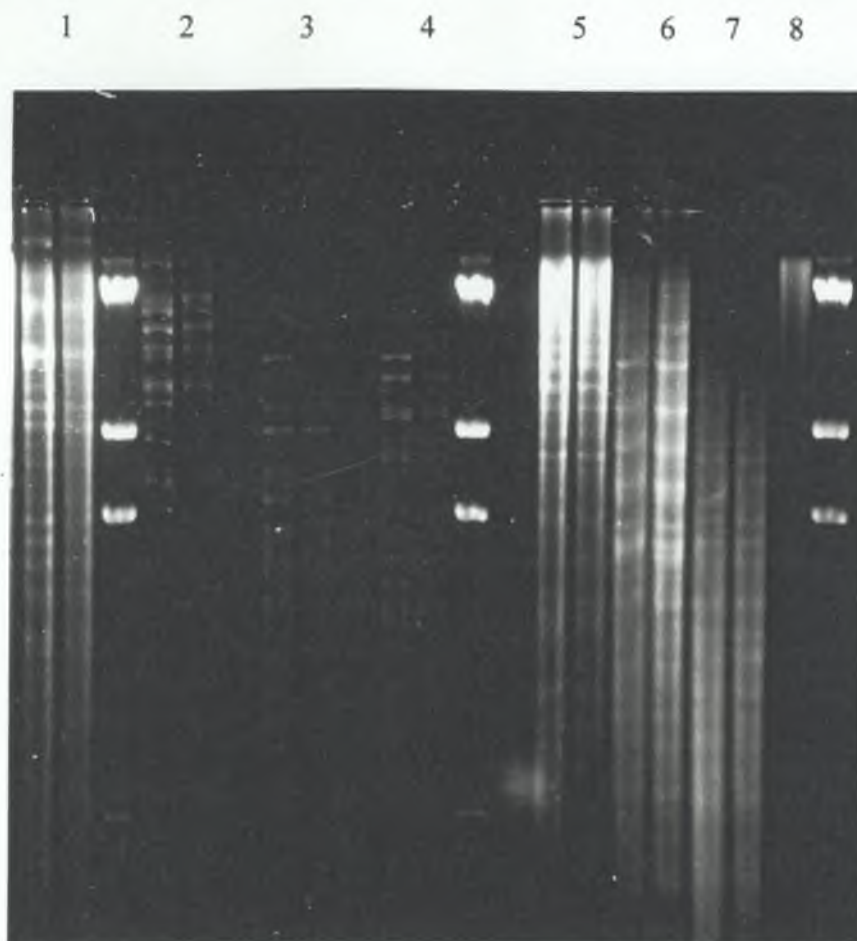
Les analyses ultérieures par RFLP n'ont plus utilisé que Eco RI qui révèle à elle seule de nombreux sites variables. L'analyse par plusieurs enzymes ne ferait que complexifier l'étude sans forcément apporter beaucoup d'informations utilisables supplémentaires.

La digestion par Eco RI fournit un profil de bandes virales tel que nous avons pu estimer la taille du génome viral à environ 155 000 pb, la vérification avec un profil Hind III donnant un résultat équivalent. C'est donc un PDV de taille moyenne, tout à fait typique des PDV du genre *Cotesia* (Volkoff, 1999). Par contre le nombre exact de cercles viraux n'est pas calculable, car les cercles peuvent se présenter sous forme

Tableau 5-1 : Enzymes de restriction testées sur le polydnavirus de *Cotesia plutellae*

Enzyme de restriction	Site de coupure reconnu	Efficacité constatée
Aat II	AGG // CCT	+
Bam HI	G // GATCC	-
Bgl II	A // GATCT	-
Dra I	TTT // AAA	*
Eco RI	G // AATTC	+++
Eco RV	GAT // ATC	+++
Hind III	A // AGCTT	+++
Hpa I	GTT // AAC	+
Ngo M IV	G // CCGGC	-
Pst I	CTGCA // G	-
Sac I	GAGCT // C	-
Sal I	G // TCGAC	++
Sma I	CCC // GGG	-
Xho I	C // TCGAG	-

* : reconnaissance de trop nombreux sites de coupure.



Lignes : pour chaque enzyme : à gauche *C. plutellae* de la Réunion, à droite du Bénin

- 1) Enzyme Bgl II, sur individus entiers
 - 2) Enzyme Xho I, sur ADN extrait d'ovaires
 - 3) Enzyme Eco RI, sur ADN extrait d'ovaires
 - 4) Enzyme Eco RV, sur ADN extrait d'ovaires
 - 5) Enzyme Acc I, sur individus entiers
 - 6) Enzyme Sma I, sur individus entiers
 - 7) Enzyme Sal I, sur individus entiers
 - 8) Enzyme Sma I sur mâles du Bénin
- Le marqueur de taille utilisé est λ /Hind III

Figure 5-5 : RFLP du polydnavirus de *Cotesia plutellae* à l'aide de différentes enzymes de restriction (ADN de dix femelles pour chaque ligne).

Les lignes 2, 3 et 4 sont reprises dans la figure 5-6 (autoradiographie)

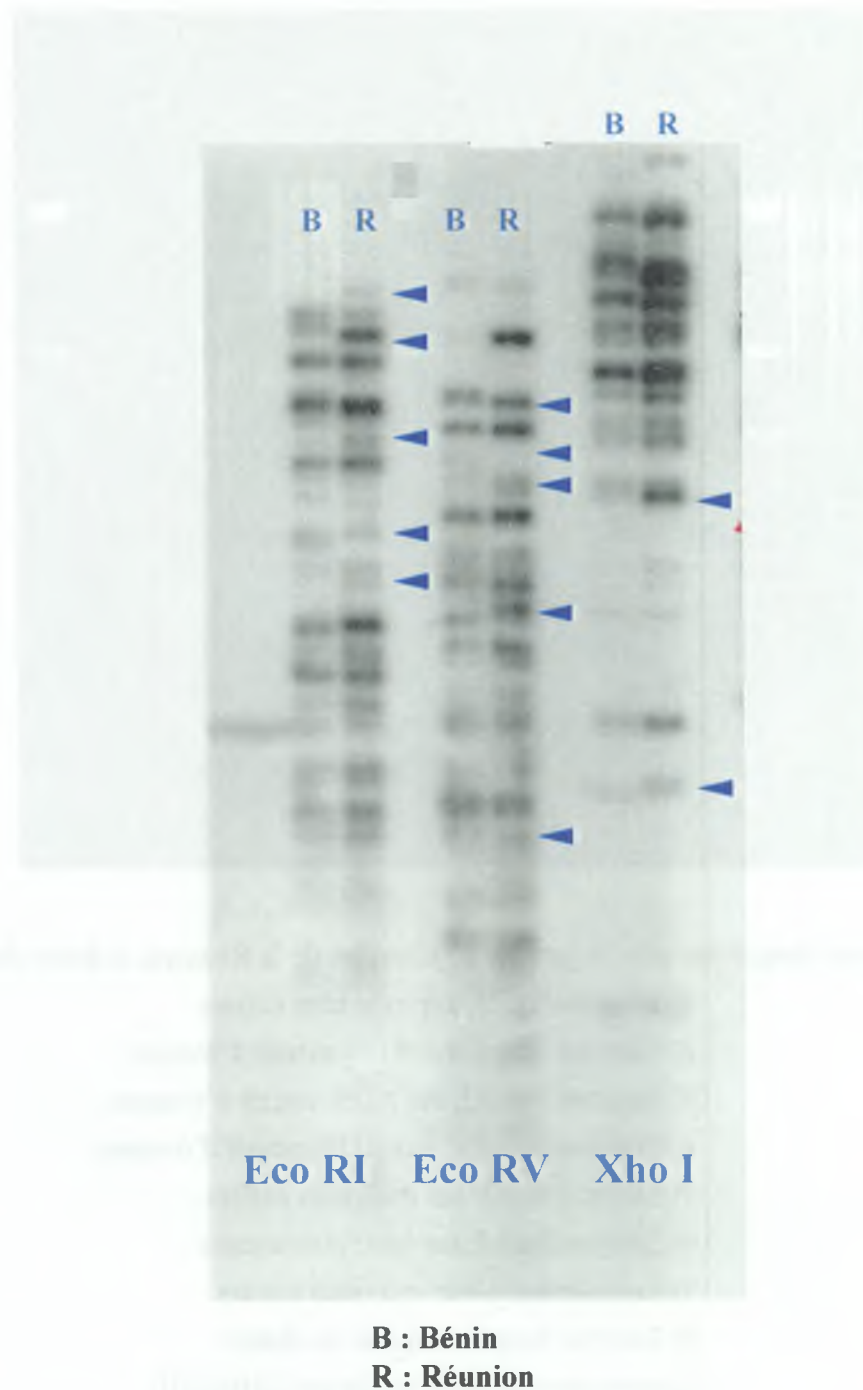


Figure 5-6: Exemples de profils RFLP obtenus par trois enzymes de restriction sur l'ADN viral provenant de *Cotesia plutellae* des populations du Bénin et de la Réunion (lot de 10 individus pour chaque ligne). Les flèches indiquent les différences constatées entre les électrophorogrammes des deux populations

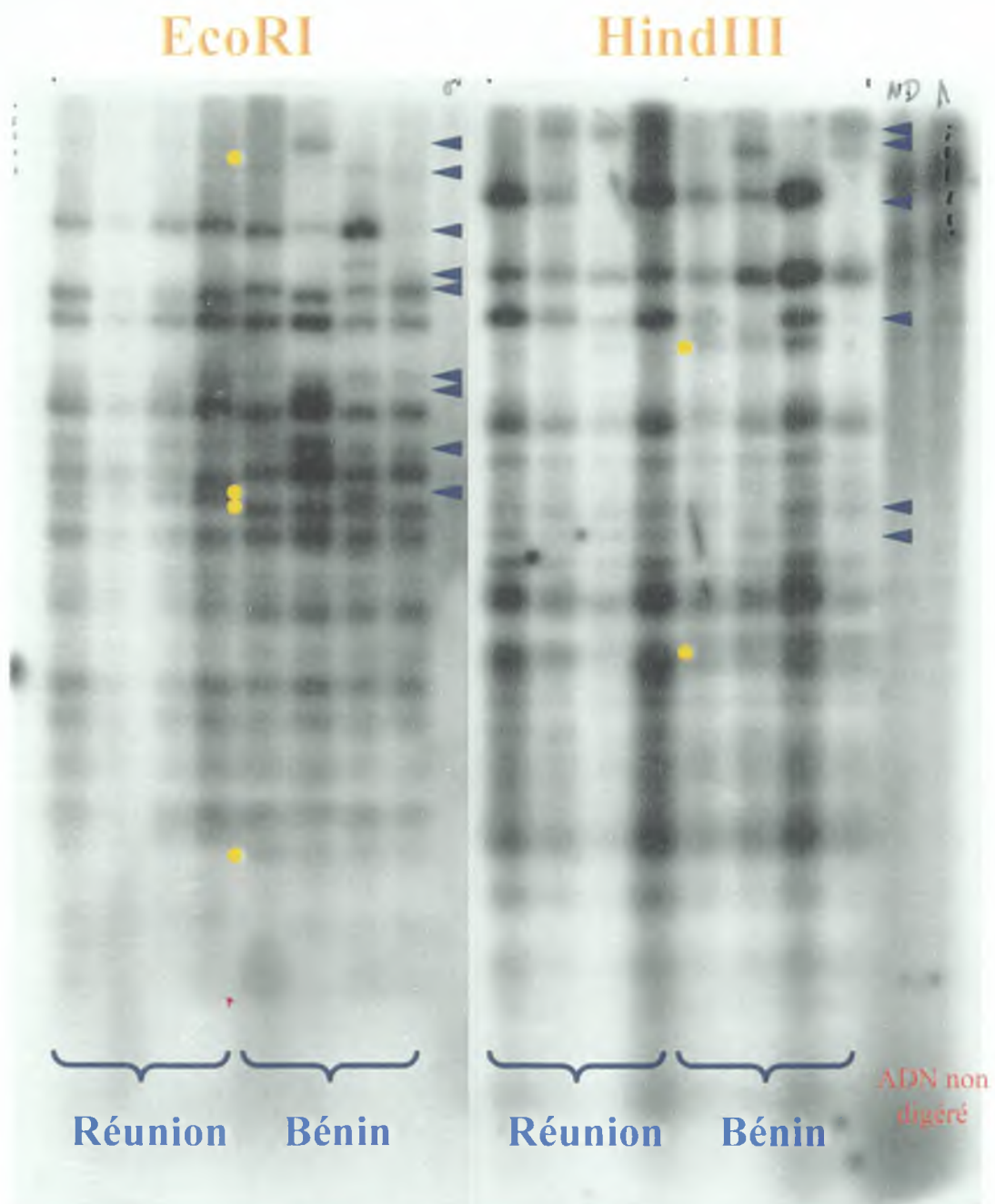


Figure 5-7 : Variabilité individuelle (flèches) et inter-populationnelle (points jaunes) de CpPDV révélée par Eco RI et Hind III pour les populations du Bénin et de la Réunion (autoradiographie, ADN viral d'une seule femelle par ligne)

d'ADN "relâché" ou "superenroulé". Or un même cercle viral migrera à des vitesses bien distinctes selon qu'il se présente sous l'une ou l'autre forme (Beckage *et al.*, 1994 ; Shelby & Webb, 1999). On peut cependant indiquer que l'on distingue au moins 10 bandes lorsque l'on fait migrer de l'ADN non digéré.

L'analyse d'individus isolés révèle une très importante variabilité individuelle : la dizaine de différences identifiées ici à l'aide de Eco RI rendent pratiquement tous les individus différents les uns des autres et d'autres enzymes telles Hind III renforcent cette différence (fig. 5-7). Il semble même y avoir plus de différences au sein d'une population qu'entre les populations testées (fig. 5-7), car on peut observer sur les profils que si de nombreuses variations individuelles sont présentes, surtout dans la population du Bénin, la grande majorité des bandes est commune aux populations étudiées. Il est cependant possible que certaines des bandes observées ici n'existent que dans certaines populations et en soient caractéristiques, comme ceci a été observé chez *Cotesia melanoscela* (Ratzeburg) (Hym. : Braconidae) (Stoltz *et al.*, 1986).

V.5.3 – Discussion

La variabilité du CpPDV semble très élevée, rejoignant en fait les résultats de Stoltz & Xu (1990) qui signalaient un polymorphisme des polydnavirus étudiés bien visible sur tous les gels RFLP que ces auteurs ont réalisés sur des Braconidés. Cependant notre étude n'a pu être poursuivie jusqu'à l'analyse informatique souhaitée car nous rencontrons encore des problèmes de reproductibilité lors de l'extraction, liées aux quantités minimales d'ADN viral mis en jeu. Il n'est donc pas possible de préciser s'il existe une variabilité entre les populations supérieure à la variabilité au sein de chaque population. Si cette dernière s'avérait plus élevée que la première, il ne serait pas possible d'utiliser le polydnavirus comme un outil de caractérisation des populations. D'un autre côté, l'absence de distinction entre les populations étudiées pourrait confirmer les résultats des croisements effectués entre ces mêmes populations (chap. II) : ces populations appartiennent toujours à la même espèce.

Toutefois des bandes caractéristiques comme celles de certaines populations de *C. melanoscela* pourraient jouer le rôle de marqueur même si la majeure partie du génome du PDV reste commun à tous les individus de l'espèce. Cette particularité, si elle se confirme, rend cet outil supérieur à l'électrophorèse isoenzymatique qui a certes permis de différencier les trois populations de *C. plutellae* étudiées mais seulement de façon globale, au niveau des fréquences alléliques, pas à celui d'un individu isolé dont on ne peut indiquer la provenance si elle n'est pas donnée au préalable.

Quelle est la source d'une telle variabilité ?

1) Il semble que nous ayons encore des problèmes de reproductibilité, auquel cas certaines bandes sont des artefacts et il conviendra de s'assurer de leur élimination complète avant de pouvoir procéder à des analyses plus détaillées.

2) Ceci est aussi lié au cycle du virus lui-même : ce symbiote intégré dans le génome de son hôte voit donc son ADN répliqué par les mêmes mécanismes, qui sont très fiables et rendent la probabilité de mutation très faible. Il ne semble donc pas que ce soit à ce niveau que des mutations puissent apparaître en nombre, mais ce serait plutôt lors de la synthèse de nouvelles particules virales dans les ovaires que le virus accumulerait de nombreuses erreurs. Il reste donc à s'assurer que l'on ait bien affaire à un marqueur neutre dans ce cas malgré sa transmission verticale par intégration génomique. Une solution plus sûre consisterait à analyser directement la séquence virale intégrée, mais encore faudrait-il savoir où elle se situe dans le génome de *C. plutellae*.

Peut-on considérer la pureté de l'ADN extrait comme suffisante ? Il semble que oui : les bandes d'ADN observées sont typiques de ce que l'on connaît chez d'autres virus, il n'y a pas de fragments d'ADN génomique en quantité suffisante pour donner un signal parasite suffisamment net. Il en est de même avec l'autoradiographie : l'hybridation négative contre de l'ADN de mâle semble indiquer une bonne spécificité de la sonde utilisée, basée sur l'ADN extrait des ovaires.

Les polydnavirus constituent un très puissant agent immunosuppresseur chez la chenille-hôte : *Microplitis plutellae* possède 20 fois moins d'ADN viral dans ses ovaires que *C. plutellae* et c'est pourtant un parasitoïde qui est considéré comme efficace en Amérique du Nord (Putnam, 1973). Les deux espèces affichent en fait des performances et un comportement parasitaire similaire sur leur hôte *P. xylostella* et il est intéressant de les voir réussir cela avec des virus de structure différentes et en quantités variables. Il conviendrait de comparer aussi le polydnavirus des espèces d'*Apanteles* attaquant *P. xylostella* au Brésil et à la Réunion, entre autres. Il a été démontré chez une autre espèce de Braconidé, *Chelonus inanitus* (L.) (Hym. : Braconidae : Cheloninae, sous-famille également dans le complexe microgastroïde de Whitfield), qu'une fraction de la quantité totale de fluide du calice présent dans les ovaires, inférieure à 1 %, peut suffire à provoquer les dérèglements physiologiques constatés chez la chenille-hôte (Soller & Lanzrein, 1996), en synergie avec le venin de la guêpe cependant.

Il faut alors se poser la question de savoir quelles différences au sein du génome des polydnavirus de ces espèces ont entraîné de telles variations quantitatives, et leur signification évolutive puisque les espèces restent efficaces malgré les millions d'années écoulées depuis la possible intégration virale chez leur ancêtre commun. Mais

il sera nécessaire de mieux connaître l'organisation génétique de ces virus et de déterminer les gènes en jeu dans le phénomène immunosuppresseur avant de pouvoir apporter une réponse à ces interrogations.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Au cours de cette étude, nous nous sommes attachés à montrer l'importante variabilité existant chez *Cotesia plutellae*, parasitoïde spécialisé de *Plutella xylostella*. Important ennemi naturel de *P. xylostella*, appelé à jouer un rôle croissant suite aux nombreux problèmes de résistance aux insecticides qui apparaissent chez ce ravageur, une meilleure connaissance de la biologie de *C. plutellae* est indispensable pour optimiser l'utilisation de cette espèce.

Malgré sa vaste aire de répartition, due en grande partie aux introductions dont ce parasitoïde a fait l'objet dans le cadre de programmes de lutte biologique, *C. plutellae* semble bel et bien une espèce unique spécifique de *P. xylostella*, du moins en ce qui concerne les populations testées au laboratoire. Les cinq populations testées pour leur polymorphisme enzymatique s'avèrent très éloignées génétiquement (ainsi que géographiquement), excepté la paire Afrique du Sud - Hong-Kong et elles restent pourtant interfécondes. Il est donc peu probable de trouver d'autres populations susceptibles de présenter un isolement génétique tel qu'elles ne seraient plus interfécondes, même s'il est vrai qu'on observe des variations morphologiques, écologiques ou "moléculaires" entre diverses populations. Ainsi l'étude de populations européennes et sud-africaines s'avère un futur sujet d'étude important car *P. xylostella* serait apparue dans l'une ou l'autre de ces régions (selon les hypothèses) et c'est probablement aussi le cas pour ses parasitoïdes, *C. plutellae* d'Afrique du Sud étant lui-même variable morphologiquement.

Dans le cadre de nouvelles séries de croisements à effectuer au laboratoire pour améliorer celles-ci, restées incomplètes, il faudra pouvoir tester un plus grand nombre d'individus pour pouvoir déceler des variations de performances biologiques entre les populations, ce qui n'a pu être pris en compte ici à cause d'une contamination par les microsporidies.

Les études de terrain ont permis par contre d'observer une très importante variabilité "écologique", tellement importante même qu'il devient difficile de déterminer les facteurs qui l'occasionnent.

Au Brésil on assiste actuellement à une raréfaction importante de *C. plutellae*. Signalé comme parasitoïde majoritaire dans la région de Brasilia il y a 20 ans, encore commun il y a à peine plus de cinq ans, il n'est pratiquement plus observé aujourd'hui. De futurs échantillonnages permettront de confirmer son déclin voire sa possible disparition, ou bien de vérifier s'il s'agit seulement d'une raréfaction temporaire. Les causes n'en sont pas connues : peut-être souffre-t-il d'une compétition accrue avec *Apanteles piceotrichosus*, un autre braconidé à comportement similaire, ou encore avec *Diadegma leontinae*, le parasitoïde majoritaire localement.

Sur l'île de la Réunion, *C. plutellae* n'est apparu que depuis cinq années et est pourtant devenue la deuxième espèce par ordre d'abondance parmi les espèces locales

de parasitoïdes de *P. xylostella*, après une autre espèce de *Diadegma* locale, là aussi majoritaire. Une autre espèce d'*Apanteles*, *A. insignicaudatus*, ayant été détectée pour la première fois sur *P. xylostella* à la Réunion, on peut à nouveau s'interroger sur le devenir de *C. plutellae* sur l'île. La situation pourrait être différente du Brésil dans la mesure où l'île offre une plus grande diversité climatique que la zone de cerrados de Brasilia, notamment suivant un gradient altitudinal et les différentes espèces de parasitoïdes pouvant ainsi se constituer des niches écologiques suffisamment distinctes pour qu'il n'y ait pas de compétition trop forte entre elles. Il semble ainsi exister des gradients altitudinaux opposés entre *C. plutellae*, thermophile et plus abondant en plaine, et *Diadegma* sp., plus psychrophile et abondant en altitude (dans la zone maraîchère en fait), ce qui pourrait expliquer sa prédominance même si les populations de *C. plutellae* ont eu une expansion rapide dans la région de Saint-Pierre au cours de ces cinq années.

Les deux zones étudiées (Brésil et Réunion) offrent une grande diversité de faune auxiliaire s'attaquant à *P. xylostella*, puisque chacune d'entre elles possède au moins sept espèces de parasitoïdes ainsi que de nombreux hyperparasites. L'origine de ces espèces reste inconnue : même si on peut supposer des introductions involontaires par l'importation de plants contaminés, il est surprenant d'envisager que cette voie ait permis d'amener autant d'espèces en quelques décennies à peine en ce qui concerne Brasilia, ville récente.

Dans les deux régions ces nombreux parasitoïdes restent incapables de réguler les populations de *P. xylostella* arrivant sur les jeunes cultures de choux, car ces dernières y croissent de façon exponentielle jusqu'à la destruction quasi-totale des parcelles expérimentales. Le seul facteur limitant semble en fait être la quantité et la qualité de la nourriture disponible, les parasitoïdes n'arrivant pas à se développer suffisamment rapidement durant cette phase exponentielle de croissance du ravageur pour limiter ses dégâts. La lutte biologique "pure" s'avère donc insuffisante dans les deux cas pour contrôler *P. xylostella*, n'étant en fait efficace que dans de rares cas, comme en Afrique du Sud où les niveaux de populations du ravageur restent toujours très faibles, ou lors d'introductions comme au Cap-Vert en 1984. La lutte chimique ne s'avère pas forcément être une solution à long terme non plus, de nombreux cas de résistance étant signalés à la Réunion comme au Brésil. Pourtant à Brasilia il n'y pas de cultures de choux en continu, la saison des pluies y étant peu propice, mais des résistances aux insecticides à action neurotoxiques sont apparues ainsi qu'une résistance au Bt.

Il faut donc envisager la lutte intégrée comme une solution plus intéressante pour gérer à la fois les problèmes de résistance de *P. xylostella* et le manque d'efficacité de ses ennemis naturels, d'ailleurs parfois lié à la présence de traitements insecticides. On pourrait ainsi envisager des traitements insecticides sélectifs (Bt, régulateurs de

croissance) pour bloquer la croissance exponentielle du ravageur sur les jeunes choux, laissant ainsi le temps aux parasitoïdes de se développer et de limiter les populations de papillons restantes vers la fin des cultures, quand le taux de parasitisme dépasse 50 %.

A noter que le taux de parasitisme moyen au Brésil a été inférieur à 25 % durant l'étude, contre près de 50 % à la Réunion. Cette rareté à Brasilia pourrait être liée à l'isolement important des parcelles de choux de l'étude par rapport aux cultures commerciales de la région : *P. xylostella*, bon migrateur, a pu s'y implanter facilement mais pas ses parasitoïdes à arrivée plus tardive. Ultérieurement, c'est le retour des pluies qui a lessivé les choux et leur entomofaune associée. A la Réunion les cultures de choux sont présentes toute l'année, situées à des distances peu importantes les unes des autres, ce qui doit faciliter pour les parasitoïdes le suivi de leur hôte même si leur action de régulation a encore été insuffisante. Mais la destruction d'un individu de ravageur sur deux est encore insuffisant, des taux de parasitisme supérieurs à 80 % voire 90 % étant nécessaires.

Curieusement le taux de parasitisme s'est avéré assez constant d'une parcelle à l'autre dans chacune des deux zones climatiques, même si la répartition des espèces était significativement différente dans les parcelles, du fait de variations climatiques locales : les facteurs en cause étant probablement l'exposition au vent à Brasilia et les différences altitudinales importantes à la Réunion. Les parasitoïdes n'arrivent donc pas à exploiter toute la ressource en chenilles-hôtes à leur disposition et on peut se demander si l'ajout d'espèces supplémentaires à la faune auxiliaire locale déjà constituée d'espèces plus ou moins spécialisées sur les différents stades de développement de *P. xylostella* permettrait un meilleur contrôle.

Le polymorphisme enzymatique de *C. plutellae* ne semble jamais avoir été étudiée jusqu'à présent. Elle s'avère pourtant intéressante à mettre à évidence, même si ce n'est pas forcément facile chez ce petit Braconidé de 3 mm de long. On observe en effet une importante différenciation génétique entre les populations étudiées (qui restent interfécondes), sous forme de variations des fréquences alléliques car il n'existe par contre pas d'allèles caractéristiques d'une population ou d'une autre. Cette différenciation est telle qu'elle permet de distinguer significativement chacune des cinq populations testées des quatre autres, excepté pour la paire Afrique du Sud – Kong-Kong, laissant supposer qu'une introduction s'est produite dans l'un ou l'autre de ces pays, sans que l'on puisse préciser le sens du passage cependant.

L'électrophorèse isoenzymatique sur acétate de cellulose est donc une technique très simple d'emploi, susceptible de permettre de créer un classement à grande échelle des populations de *C. plutellae* existant dans le monde. La biochimie fournissant cependant un stock de marqueurs assez réduit, il serait préférable de l'appuyer par des techniques de biologie plus informatives.

De plus, si on peut éventuellement espérer corréler l'efficacité de certaines populations de *C. plutellae* avec des marqueurs enzymatiques, ceux révélabes ici ne peuvent guère expliquer de telles variations.

Un autre marqueur moléculaire pourrait par contre s'avérer plus profitable dans la recherche d'une quantification des performances de *C. plutellae* : il s'agit de l'étude de son polydnavirus symbiotique. Ce virus très spécialisé, inféodé à *C. plutellae* jusqu'à s'intégrer à son génome, ne peut plus se transmettre que de façon verticale par l'intermédiaire des ovaires des femelles. S'il dépend ainsi totalement du parasitoïde pour sa transmission, il lui est aussi essentiel pour assurer la réussite du parasitisme et il doit donc subir une pression de sélection face aux défenses immunitaires de la chenille-hôte, le poussant à optimiser sans cesse son efficacité pour maintenir ses capacités immunosuppressives.

Son extraction s'est avérée aisée et on peut espérer disposer ici d'un marqueur intéressant et peu complexe d'utilisation grâce à l'emploi direct de la RFLP sur l'ADN viral. Comme cela avait déjà été signalé chez une autre espèce de *Cotesia*, on observe un polymorphisme très important de l'ADN viral au point qu'il ne semble pas y avoir deux individus identiques sur les gels étudiés. Ceci rend problématique la caractérisation des populations, à moins de trouver des bandes marqueurs à ce niveau d'identification. Globalement les profils de restriction sont similaires entre les individus étudiés, confirmant encore l'appartenance à une seule et même espèce de ces populations de *C. plutellae*.

Malheureusement le manque de connaissances actuel sur le génome des polydnavirus et leur mode d'action empêche de vérifier quel rôle exact ils jouent dans l'existence de différences de performances entre les populations du parasitoïde porteur. Pourtant, lorsque l'on observe qu'une espèce voisine de *C. plutellae*, *Microplitis plutellae*, possède environ vingt fois moins de polydnavirus (avec une morphologie très différente) que la première tout en étant aussi efficace contre *P. xylostella* (en Amérique du Nord), on peut supposer que les variations génétiques des polydnavirus jouent un rôle essentiel dans le succès parasitaire de ces braconidés.

La poursuite des expériences est donc nécessaire afin de disposer d'un meilleur échantillonnage de populations de *C. plutellae*, et de déterminer de façon plus précise leur niveau d'efficacité si l'on veut améliorer le taux de réussite lors des projets d'introductions qui continuent à être envisagés dans le monde. Mais il faudra développer aussi l'utilisation de la lutte intégrée au sein des pays tropicaux, les plus concernés par les problèmes dus à *P. xylostella*, si l'on veut réussir à contrôler ce ravageur et ses immenses capacités d'adaptation aux traitements engagés contre lui.

BIBLIOGRAPHIE

RECEIVED

- 1 **Abro G. H., Soomro R. A., Syed T. S., 1992.** Biology and behaviour of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Pakistan Journal of Zoology* **24**: 7-10.
- 2 **Alam M. M., 1992.** Diamondback moth and its natural enemies in Jamaica and some other Caribbean islands. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth and other crucifer pests: Proceedings of the second International Workshop*, Tainan, Taiwan, 10-14 December 1990, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 233-243.
- 3 **Alborn H. T., Turlings T. C. J., Jones T. H., Stenhagen G., Loughrin J. H., Tumlinson J. H., 1997.** An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. *Science* **276**: 945-948.
- 4 **Albrecht U., Wyler T., Pfister-Wilhelm R., Gruber A., Stettler P., Heiniger P., Kurt E., Schümperli D., Lanzrein B., 1994.** Polydnavirus of the parasitic wasp *Chelonus inanitus* (Braconidae): characterisation, genome organisation and time point replication. *Journal of General Virology* **75**: 3353-3363.
- 5 **Alvi S. M., Momoi S., 1994.** Environmental regulation and geographical adaptation of diapause in *Cotesia plutellae* (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of the diamondback moth larvae. *Applied Entomology and Zoology* **29**: 89-95.
- 6 **Andrews K. L., Sanchez R. J., Cave R. D., 1992.** Management of diamondback moth in Central America. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth and other crucifers pests: Proceedings of the second International Workshop*, Tainan, Taiwan, 10-14 December 1990, Asian vegetable Research and Development Center. p. 487-497.
- 7 **Ankersmith G. W., 1953.** DDT-resistance in *Plutella maculipennis* (Curt.) (Lep.) in Java. *Bulletin of Entomological Research* **44**: 421-425.
- 8 **Asayama T., 1986.** Pathology and morphogenesis of a granulosis virus of the diamondback moth. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth Management: Proceedings of the first International Workshop*, Tainan, Taiwan, 11-15 March 1985, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 205-212.
- 9 **Asgari S., Schmidt O., Theopold U., 1997.** A polydnavirus-encoded protein of an endoparasitoid wasp is an immune suppressor. *Journal of General Virology* **78**: 3061-3070.
- 10 **Balachowsky A. S., 1966.** Hyponomeutidae - sous-famille des Plutellinae. In:

- 11 **Barbosa S., França F. H., 1981.** Dinamica populacional de pragas de repolho no Distrito Federal. In: *Congresso Brasileiro de Entomologia*, 7, Fortaleza, Sociedade Entomologica do Brasil. p. 167.
- 12 **Barratt B. I. P., Evans A. A., Stoltz D. B., Vinson S. B., Easingwood R., 1999.** Virus-like particles in the ovaries of *Microctonus aethiopoides* Loan (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of adult weevils (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Invertebrate Pathology* **73**: 182-188.
- 13 **Baur M. E., Kaya H. K., Tabashnik B. E., 1997.** Efficacy of a dehydrated steinernematid nematode against black cutworm (Lepidoptera: Noctuidae) and diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Economic Entomology* **90**: 1200-1206.
- 14 **Baur M. E., Kaya H. K., Tabashnik B. E., Chilcutt C. F., 1998.** Suppression of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) with an entomopathogenic nematode (Rhabditida: Steinernematidae) and *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Journal of Economic Entomology* **91**: 1089-1095.
- 15 **Beckage N. E., Tan F. E., Schleifer K. W., Lane R. D., Cherubin L. L., 1994.** Characterization and biological effects of *Cotesia congregata* polydnavirus on host larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **26**: 165-195.
- 16 **Beckage N. E., 1998a.** Parasitoids and polydnaviruses. *BioScience* **48**: 305-311.
- 17 **Beckage N. E., 1998b.** Modulation of immune responses to parasitoids by polydnaviruses. *Parasitology* **116**: S57-S64.
- 18 **Beckage N., 1998c.** Les armes secrètes des guêpes parasitoïdes. *Pour La Science* n° 243: 54-59.
- 19 **Becker M., 1989.** Uma nova especie do gênero *Spilochalcis* Thompson, 1876 (Hymenoptera, Chalcididae). *Revista Brasileira de Entomologia* **33**: 337-340.
- 20 **Begum S., Tsukuda R., Fujisaki K., Nakasuji F., 1996.** The effects of wild cruciferous hosts plants on morphology, reproductive performance and flight activity in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Researches in Population Ecology* **38**: 257-263.

- 21 **Bodnaryk R. P., 1997.** Will low-glucosinolate cultivars of the mustards *Brassica juncea* and *Sinapis alba* be vulnerable to insects pests ? *Canadian Journal of Plant Science* **77**: 283-287.
- 22 **Bogahawatte C. N. L., van Emden H. F., 1996.** The influence of the host plant of diamondback moth (*Plutella xylostella*) on the plant preferences of its parasitoid *Cotesia plutellae* in Sri Lanka. *Physiological Entomology* **21**: 93-96.
- 23 **Bonnemaïson L., 1965.** Insects pests of crucifers and their control. *Annual Review of Entomology* **10**: 233-256.
- 24 **Bordat D., Cocquard J., Renand M., 1984.** Quelques moyens de lutte pour enrayer les nosémoses de trois foreurs des graminées élevés en laboratoire sur milieu nutritif artificiel. *L'Agronomie Tropicale* **39**: 275-285.
- 25 **Bordat D., Goudegnon A. E., Bouix G., 1994.** Relationships between *Apanteles flavipes* (Hym.: Braconidae) and *Nosema bordati* (Microspora, Nosematidae) parasites of *Chilo partellus* (Lep.: Pyralidae). *Entomophaga* **39**: 21-32.
- 26 **Bordat D., Goudegnon A. E., 1997.** The status of diamondback moth and its natural enemies in the Porto Novo and Cotonou areas in Benin. In: Sivapragasam A., Loke W. H., Hussan A. K., Lim G. S. (eds), *The Management of Diamondback moth and other crucifer pests: Proceedings of the third International Workshop*, Kuala Lumpur, Malaysia, 29 October-1 November 1996, Malaysian Agricultural Research and Development Institute (MARDI) & Malaysian Plant Protection Society. p. 312-313.
- 27 **Bournoville R., Simon J. C., Badenhauer I., Girousse C., Guilloux T., André S., 2000.** Clones of pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae) distinguished using genetic markers, differ in their damaging effect on a resistant alfalfa cultivar. *Bulletin of Entomological Research* **90**: 33-39.
- 28 **Bowman H. G., Hultmark D., 1987.** Cell-free immunity in insects. *Annual Review of Microbiology* **41**: 103-126.
- 29 **Brown F., 1986.** The classification and nomenclature of viruses: summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in Sendai, September 1984. *Intervirology* **25**: 141-143.
- 30 **de Buron I., Beckage N. E., 1992.** Characterization of a polydnavirus (PDV) and virus-like filamentous particle (VLFP) in the braconid wasp *Cotesia congregata* (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Invertebrate Pathology* **59**: 315-327.

- 31 **Butts R. A., McEwen F. L., 1981.** Seasonal populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae), in relation to degree-day accumulation. *The Canadian Entomologist* **113**: 127-131.
- 32 **Cameron P. J., Walker G. P., Keller M. A., Clearwater J. R., 1997.** Host specificity assessments of *Cotesia plutellae*, a parasitoid of diamondback moth. In: Sivapragasam A., Loke W. H., Hussan A. K., Lim G. S. (eds), *The Management of Diamondback moth and other crucifer pests: Proceedings of the third International Workshop*, Kuala Lumpur, Malaysia, 29 October-1 November 1996, Malaysian Agricultural Research and Development Institute (MARDI) & Malaysian Plant Protection Society. p. 85-89.
- 33 **Carton Y., Nappi A., 1991.** The *Drosophila* immune reaction and the parasitoid capacity to evade it: genetic and coevolutionary aspects. *Acta Oecologica* **12**: 89-104.
- 34 **Carton Y., Frey F., Nappi A., 1991.** Comment l'insecte se défend-t-il contre ses parasitoïdes ? *Insectes (OPIE)* **80**: 15-16.
- 35 **Castelo-Branco M., Gatehouse A. G., 1999.** Food availability and larval density affect ovarian development in *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil*. **28**: 611-616.
- 36 **Chapman R. F., 1982.** *The insects - Structure and function*. Harvard University Press, 952 p.
- 37 **Charleston D. S., Kfir R., 1999.** The possibility of using Indian mustard as a trap crop for the diamondback moth, *Plutella xylostella*, in South Africa. In: van Renburg J. B. J., van den Berg J. (eds), *Proceedings of the twelfth Entomological Congress*, Potchefstroom, 12-15 July 1999, Entomological Society of Southern Africa. p. 19.
- 38 **Chaufaux J., 1995.** Utilisation de biopesticides contre les ravageurs des cultures: le point sur *Bacillus thuringiensis*. *Insectes (OPIE)* **97**: 2-6.
- 39 **Chàves H. A., Diaz F. A., Briceno R. A., 1993.** Introduccion a Venezuela y biologia de *Cotesia plutellae* (Kurdj.) (Hym.: Braconidae), parasitoide de *Plutella xylostella* (L.) (Lep.: Plutellidae). *Manejo Integrado de Plagas (Costa-Rica)* **29**: 24-27.

- 40 **Chelliah S., Srinivasan K., 1986.** Bioecology and management of diamondback moth in India. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth Management: Proceedings of the first International Workshop*, Tainan, Taiwan, 11-15 March 1985, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 63-76.
- 41 **Chen J. S., Sun C. N., 1986.** Resistance of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) to a combination of fenvalerate and piperonyl butoxide. *Journal of Economic Entomology* **79**: 22-30.
- 42 **Cheng E. Y., 1986.** The resistance, cross resistance, and chemical control of diamondback moth in Taiwan. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth Management: Proceedings of the first International Workshop*, Tainan, Taiwan, 11-15 March 1985, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 329-345.
- 43 **Cheng E. Y., 1988.** Problems of control of insecticide-resistant *Plutella xylostella*. *Pesticide Science* **23**: 177-188.
- 44 **Chow Y. S., Chu S. C., Chen C. C., 1974.** Demonstration of a sex pheromone of the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Annals of the Entomological Society of America* **67**: 510-512.
- 45 **Chow Y. S., Lim Y. M., Tang H. J., 1986.** Morphological and biological evidence for the presence of a male sex pheromone of the diamondback moth. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth Management: Proceedings of the first International Workshop*, Tainan, Taiwan, 11-15 March 1985, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 103-108.
- 46 **Chown S. L., Avenant N., 1992.** Status of *Plutella xylostella* at Marion Island six years after its colonisation. *South African Journal of Antarctic Research* **22**: 37-40.
- 47 **Chu Y.-I., 1986.** The migration of diamondback moth. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth Management: Proceedings of the first International Workshop*, Tainan, Taiwan, 11-15 March 1985, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 77-81.
- 48 **Chua T. H., Lim B. H., 1979.** Distribution pattern of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) on choy-sum plants. *Zeitschrift fur Angewandte Entomologie* **88**: 170-175.

- 49 **Chua T. H., Ooi P. A. C., 1986.** Evaluation of three parasites in the biological control of diamondback moth in the Cameron Highlands, Malaysia. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth Management: Proceedings of the first International Workshop*, Tainan, Taiwan, 11-15 March 1985, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 175-184.
- 50 **CIE, 1967.** Distribution map of *Plutella xylostella* (L.). Commonwealth Institute of Entomology, World. n° 32, 1-3.
- 51 **Clausen C. P., 1940.** *Entomophagous insects*. McGraw-Hill, New York. 688 p.
- 52 **Cock M. J. W., 1985.** *A review of biological control of pests in the Commonwealth Caribbean and Bermuda up to 1982*. Technical Communication n° 9 of the Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, UK. 218 p.
- 53 **Cordero J., Cave R. D., 1992.** Natural enemies of *Plutella xylostella* (Lep.: Plutellidae) on crucifers in Honduras. *Entomophaga* **37**: 397-407.
- 54 **Crafford J. E., Chown S. L., 1987.** *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) on Marion Island. *Journal of the Entomological Society of South Africa* **50**: 259-260.
- 55 **Davies D. H., Vinson S. B., 1986.** Passive evasion by eggs of braconid parasitoid *Cardiochiles nigriceps* of encapsulation *in vitro* by haemocytes of host *Heliothis virescens*. Possible role for fibrous layer in immunity. *Journal of Insect Physiology* **32**: 1003-1010.
- 56 **Delucchi V., Tadic M., Bogavac M., 1954.** L'élevage en masse de *Apanteles plutellae* Kurdj. (Hym., Braconidae) et de *Angitia tibialis* Grav. (Hym., Ichneumonidae), parasites endophages de *Plutella maculipennis* Curt., et notes biologiques sur ces parasites. *Zastita Bilja (Plant Protection)*, Belgrade **21**: 20-41.
- 57 **Doucet D., Cusson M., 1996.** Alteration of developmental rate and growth of *Choristoneura fumiferana* parasitized by *Tranosema rostrale*: role of calyx fluid. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **81**: 21-30.
- 58 **Drezen J. M., Poirié M., Bigot Y., Periquet G., 1997.** Utiliser un virus pour parasiter autrui. *La Recherche* **296**: 86-89.
- 59 **Drezen J. M., Savary S., Poirié M., Periquet G., 1999.** Les polydnavirus, des entités virales domestiquées par les guêpes parasites. *Virologie* **3**: 11-21.

- 60 **Eastal S., Boussy I. A., 1987.** A sensitive and efficient isoenzyme technique for small arthropods and others invertebrates. *Bulletin of Entomological Research* **77**: 407-415.
- 61 **Eckenrode C. J., Dickson M. H., Lin J., 1986.** Resistance in crucifers to diamondback moth and other lepidopterous pests. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth Management: Proceedings of the first International Workshop*, Tainan, Taiwan, 11-15 March 1985, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 129-136.
- 62 **Edson K. M., Stoltz S. B., Summers M. D., 1981.** Virus in a parasitoid wasp: suppression of the cellular immune response in the parasitoid's host. *Science* **211**: 582-583.
- 63 **Eigenbrode S. D., Shelton A. M., Dickson M. H., 1990.** Two types of resistance to the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) in cabbage. *Environmental Entomology* **19**: 1086-1090.
- 64 **Eigenbrode S. D., Shelton A. M., 1992.** Resistance to diamondback moth in *Brassica*: Mechanisms and potential for resistant cultivars. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth and other crucifer pests: Proceedings of the second International Workshop*, Tainan, Taiwan, 11-14 December 1990, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 213-224.
- 65 **van Emden H. F., 1999.** Transgenic host plant resistance to insects - Some reservations. *Annals of the Entomological Society of America* **92**: 788-797.
- 66 **Etienne J., 1973.** Lutte biologique et aperçu sur les études entomologiques diverses effectuées ces dernières années à la Réunion. *L'Agronomie Tropicale* **28**: 683-687.
- 67 **FAO, 2000.** <http://apps.fao.org>.
- 68 **Fauziah H. I., Dzolkhifli O., Wright D. J., 1992.** Resistance to acylurea compounds in diamondback moth. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth and other crucifer pests: Proceedings of the second International Workshop*, Tainan, Taiwan, 10-14 December 1990, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 391-401.
- 69 **Federici B. A., Maddox J. V., 1996.** Host specificity in microbe-insect interactions. *BioScience* **46**: 410-421.

- 70 **Ferronato E. M., Becker M., 1984.** Abundância e complexo de parasitoides de *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) em *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C. *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil* **13**: 261-278.
- 71 **Finch S., Kienegger M., 1997.** A behavioural study to help clarify how undersowing with clover affects host-plant selection by pests insects of brassica crops. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **84**: 165-172.
- 72 **Fitton M., Walker A., 1992.** Hymenopterous parasitoids associated with diamondback moth: the taxonomic dilemma. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth and other crucifer pests: Proceedings of the second International Workshop*, Tainan, Taiwan, 10-14 December 1990, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 225-232.
- 73 **Fleming J. A. G. W., Summers M. D., 1986.** *Campoletis sonorensis* endoparasitic wasps contains forms of *C. sonorensis* virus DNA suggestive of integrated and extrachromosomal polydnavirus DNAs. *Journal of Virology* **57**: 552-562.
- 74 **Fleming J. A. G. W., Summers M. D., 1991.** Polydnavirus DNA is integrated in the DNA of its parasitoid wasp host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **88**: 9770-9774.
- 75 **Furlong M. J., Wright D. J., 1993.** Effect of the acylurea insect growth regulator teflubenzuron on the endo-larval stages of the hymenopteran parasitoids *Cotesia plutellae* and *Diadegma semiclausum* in a susceptible and an acylurea-resistant strain of *Plutella xylostella*. *Pesticide Science* **39**: 305-312.
- 76 **Furlong M. J., Pell J. K., 1996.** Interactions between the fungal entomopathogen *Zoopthora radicans* Brefeld (Entomophthorales) and two hymenopteran parasitoids attacking the diamondback moth, *Plutella xylostella* L. *Journal of Invertebrate Pathology* **68**: 15-21.
- 77 **Goudegnon A. E., Kirk A. A., Schiffrers B., Bordat D., 2000.** Comparative effects of deltamethrin and neem kernel solution treatments on diamondback moth and *Cotesia plutellae* (Hym., Braconidae) parasitoid populations in the Cotonou peri-urban area in Benin. *Journal of Applied Entomology* **124**: 141-144.
- 78 **Greaves T., 1945.** Experiments on the control of cabbage pests in North Queensland. *Journal of the Council of scientific and industrial Research of Australia* **18**: 110-120.

- 79 **Grewal P. S., Webb K., van Beek N. A. M., Dimock M. B., Georgis R., 1998.** Virulence of *Anagrapha falcifera* Nuclear Polyhedrosis Virus to economically significant Lepidoptera. *Journal of Economic Entomology* **91**: 1302-1306.
- 80 **Gruarin S., 1998.** Influence d'une microsporidie sur la biologie d'*Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov) (Hymenoptera: Eulophidae), parasitoïde de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). Ecole Nationale d'Ingenieurs des Travaux Agricoles, Bordeaux. 44 p.
- 81 **Gruber A., Stettler P., Heiniger P., Schümperli D., Lanzrein B., 1996.** Polydnavirus DNA of the braconid wasp *Chelonus inanitus* is integrated in the wasp's genome and excised only in later pupal and adult stages of the female. *Journal of General Virology* **77**: 2873-2879.
- 82 **Guillot F. S., Vinson D. B., 1972.** Sources of substances which elicit a behavioural response from the insect parasitoid, *Campoletis perdinctus*. *Nature* **235**: 169-170.
- 83 **Guilloux T., Monnerat R., Branco M. C., Vayssières J. F., Bordat D., 2000.** Comparison of populations of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae) and its parasitoids in two distinct tropical areas. *Biocontrol* (soumis)
- 84 **Gupta P. D., Thornsteinson A. J., 1960a.** Food plant relationship of the diamondback moth (*Plutella maculipennis* (Curt.)). I. Gustation and olfaction in relation to botanical specificity of the larva. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **3**: 241-250.
- 85 **Gupta P. D., Thornsteinson A. J., 1960b.** Food plant relationship of the diamondback moth (*Plutella maculipennis* (Curt.)). II. Sensory regulation of oviposition of the adult female. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **3**: 305-314.
- 86 **Gupta P., Ferkovich S. M., 1998.** Interaction of calyx fluid and venom from *Microplitis croceipes* (Braconidae) on developmental disruption of the natural host, *Helicoverpa zea*, and two atypical hosts, *Galleria mellonella* and *Spodoptera exigua*. *Journal of Insect Physiology* **44**: 713-719.
- 87 **Gustafsson M., 1994.** Biosystematics studies in the *Brassica oleracea* cytodeme. In: General Secretary of the Concil of Europe, *Conservation of the wild relatives of european cultivated plants*, Gibilmanna, Palermo, 21-27 September 1994.

- 88 **Gustafsson M., Lannér-Herrera C., 1997.** Overview of the *Brassica oleracea* complex: their distribution and ecological specificities. *Boccone* **7**: 27-37.
- 89 **Hama H., Suzuki K., Tanaka H., 1992.** Inheritance and stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* formulations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Applied Entomology and Zoology* **27**: 355-362.
- 90 **Hamm J., Styer E., Lewis W. J., 1990.** Comparative virogenesis of filamentous virus and polydnavirus in the female reproductive tract of *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Invertebrate Pathology* **55**: 357-374.
- 91 **Haque M. A., Canning E. U., Wright D. J., 1999.** Entomopathogenicity of *Vairimorpha* sp. (Microsporidia) in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Bulletin of Entomological Research* **89**: 147-152.
- 92 **Harcourt D. G., Cass L. M., 1955.** Studies on control of caterpillars on cabbage in the Ottawa Valley, 1953-1954. *Canadian Journal of Agricultural Science*. **35**: 568-572.
- 93 **Harcourt D. G., 1957.** Biology of the diamondback moth, *Plutella maculipennis* (Curt.) (Lepidoptera: Plutellidae), in Eastern Ontario. II. Life-history, behaviour, and host relationships. *The Canadian Entomologist* **89**: 554-564.
- 94 **Harcourt D. G., Cass L. M., 1966.** Photoperiodism and fecundity in *Plutella maculipennis* (Curt.). *Nature* **210**: 217-218.
- 95 **Harcourt D. G., 1986.** Population dynamics of the diamondback moth in Southern Ontario. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth Management: Proceedings of the first International Workshop*, Tainan, Taiwan, 11-15 March 1985, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 3-15.
- 96 **Hardy J. H., 1938.** *Plutella maculipennis*, Curt., its natural and biological control in England. *Bulletin of Entomological Research* **29**: 343-372.
- 97 **Hänel C., Chown S. L., Davies L., 1998.** Records of alien insect species from sub-Antarctic Marion and South Georgia Islands. *African Entomology* **6**: 366-369.
- 98 **Hebert P. D. N., Beaton M. J., 1993.** *Methodologies for allozyme analysis using cellulose acetate electrophoresis*. Helena Laboratories, Beaumont, Texas. 32 p.

- 99 **Hermawan W., Tsukuda R., Nakajima S., Fujisaki K., Nakasuji F., 1998.** Oviposition deterrent activity of andrographolide against the diamondback moth (DBM), *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Applied Entomology and Zoology* **33**: 239-241.
- 100 **Hillis D. H., Moritz C., Mable B. K. (eds), 1996.** *Molecular systematics*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 655 p.
- 101 **Hirashima Y., Nohara K., Miura T., 1990.** Studies on the biological control of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus) 1. Insect natural enemies and their utilisation. *Scientific Bulletin of the Faculty of Agronomy, Kyushu University* **44**: 65-70.
- 102 **Hita M. T., Poirié M., Leblanc N., Lemeunier F., Lutcher F., Frey F., Periquet G., Carton Y., 1999.** Genetic localization of a *Drosophila melanogaster* resistance gene to a parasitoid wasp and physical mapping of the region. *Genome Research* **9**: 471-481.
- 103 **Honda K. I., Miyahara Y., Kegasawa K., 1992.** Seasonal abundance and the possibility of spring immigration of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae), in Morioka City, Northern Japan. *Applied Entomology and Zoology* **27**: 517-524.
- 104 **Honda K.-I., 1992.** Hibernation and migration of diamondback moth in Northern Japan. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth and other crucifer pests: Proceedings of the second International Workshop*, Tainan, Taiwan, 10-14 December 1990, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 43-50.
- 105 **Huckett H. C., 1934.** Field tests on Long Island of derris as an insecticide for the control of cabbage worms. *Journal of Economic Entomology* **27**: 440-445.
- 106 **Idris A. B., Grafius E., 1993a.** Fields studies on the effect of pesticides on the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) and parasitism by *Diadegma insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Journal of Economic Entomology* **86**: 1196-1202.
- 107 **Idris A. B., Grafius E., 1993b.** Pesticides affect immature stages of *Diadegma insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae) and its host, the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Economic Entomology* **86**: 1203-1212.

- 108 **Idris A. B., Grafius E., 1996.** Effects of wild and cultivated host plants on oviposition, survival, and development of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) and its parasitoid *Diadegma insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Environmental Entomology* **25**: 825-833.
- 109 **Iqbal M., Wright D. J., 1996.** Host resistance to insecticides can confer protection to endo-larval parasitoids. *Bulletin of Entomological Research* **86**: 721-723.
- 110 **Jones D., 1996.** Biochemical interaction between chelonine wasps and their lepidopteran hosts: after a decade of research - the parasite is in control. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **26**: 981-996.
- 111 **Justus K. A., Mitchell B. K., 1996.** Oviposition site selection by the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Insect Behaviour* **9**: 987-989.
- 112 **Kadir H. A., 1992.** Potential of several baculoviruses for the control of diamondback moth and *Crocicidolomia binotalis* on cabbage. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth and other crucifer pests: Proceedings of the second International Workshop*, Tainan, Taiwan, 10-14 December 1990, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 185-192.
- 113 **Kao S. S., Tzeng C.-C., 1992.** Toxicity of insecticides to *Cotesia plutellae*, a parasitoid of diamondback moth. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth and other crucifer pests: Proceedings of the second International Workshop*, Tainan, Taiwan, 10-14 December 1990, Asian Vegetable research and Development Center. p. 287-296.
- 114 **Kartzov A. S., 1914.** The cultivation of onions, leeks and garlic. *Progressive fruit-growing and market-gardening* **6**: 1-31.
- 115 **Kfir R., 1997.** Parasitoids of *Plutella xylostella* (Lep.: Plutellidae) in South Africa: an annotated list. *Entomophaga* **42**: 517-523.
- 116 **Kfir R., 1998.** Origin of the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Annals of the Entomological Society of America* **91**: 164-167.
- 117 **Kim M. H., Lee S. C., 1991.** Bionomics of diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) in southern region of Korea. *Korean Journal of Applied Entomology* **30**: 169-173.

- 118 **Kitano H., 1982.** Effect of the venom of the gregarious parasitoid *Apanteles glomeratus* on its hemocytic encapsulation by the host, *Pieris*. *Journal of Insect Physiology* **40**: 61-67.
- 119 **Kitano H., 1986.** The role of *Apanteles glomeratus* venom in the defensive response of its host, *Pieris rapae crucivora*. *Journal of Insect Physiology*. **32**: 369-475.
- 120 **Klemm U., Guo M. F., Lai L. F., Schmutterer H., 1992.** Selection of effective species or strains of *Trichogramma* eggs parasitoids of diamondback moth. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth and other Crucifers pests: Proceedings of the second International Workshop*, Tainan, Taiwan, 10-14 December 1990, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 317-323.
- 121 **Kolodny-Hirsch D. M., van Beek N. A. M., 1997.** Selection of a morphological variant of *Autographa californica* Nuclear Polyedrosis Virus with increased virulence following serial passages in *Plutella xylostella*. *Journal of Invertebrate Pathology* **69**: 205-211.
- 122 **Kraaijeveld A. R., Godfray H. C. J., 1999.** Geographic patterns in the evolution of resistance and virulence in *Drosophila* and its parasitoids. *The American Naturalist* **153**: S61-S74.
- 123 **Krell P. J., Stoltz D. B., 1979.** Unusual baculovirus of the parasitoid wasp *Apanteles melanoscelus*: isolation and preliminary characterization. *Journal of Virology* **29**: 1118-1120.
- 124 **Krell P. J., Summers M. D., Vinson S. B., 1982.** Virus with a multipartite superhelical DNA genome from the ichneumonid parasitoid *Campoletis sonorensis*. *Journal of Virology* **43**: 859-870.
- 125 **Kurdjumov N. V., 1912.** Hyménoptères - parasites nouveaux ou peu connus. *Revue Russe d'Entomologie* **12**: 223-240.
- 126 **Lavine M. D., Beckage N. E., 1995.** Polydnviruses: potent mediators of insect immune dysfunction. *Parasitology Today* **11**: 368-378.
- 127 **Lello E. R., Patel M. N., Matthews G. A., Wright D. J., 1996.** Application technology for entomopathogenic nematodes against foliar pests. *Crop Protection*. **15**: 567-574.

- 128 Leskovar D. I., Boales A. K., 1996. Azadirachtin: potential use for controlling lepidopterous insects and increasing marketability of cabbage. *HortScience* 31: 405-409.
- 129 Lim G. S., 1986. Biological control of diamondback moth. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth Management: Proceedings of the first International Workshop*, Tainan, Taiwan, 11-15 March 1985, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 159-171.
- 130 Lipa J. J., Santiago-Alvarez C., Papp J., Aldebis H. K., Vargas-Osuna E., Caballero P., 1993. *Ocnogyna baetica* (Rambur) (Lepidoptera: Arctiidae) hôte d'hiver pour *Cotesia plutellae* (Kurdjumov) et *Glyptapanteles compressiventris* (Muesebeck) (Hymenoptera: Braconidae) en Espagne. *Annales de la Société Entomologique de France* 29: 435-437.
- 131 Liu M. Y., Tzeng Y. J., Sun C. N., 1981. Diamondback moth resistance to several synthetic pyrethroids. *Journal of Economic Entomology* 74: 393-396.
- 132 Liu M. Y., Tzeng Y. J., Sun C. N., 1982. Insecticide resistance in the diamondback moth. *Journal of Economic Entomology* 75: 153-155.
- 133 Liu Y. B., Tabashnik B. E., 1997. Visual determination of sex of diamondback moth larvae. *The Canadian Entomologist* 129: 585-586.
- 134 Lloyd D. C., 1940. Host selection by hymenopterous parasites of the moth *Plutella maculipennis* Curtis. *Proceedings of the Royal Society of London, series B* 128: 451-484.
- 135 Loke W. H., Heng C. K., Basirun N., Mardi A. R., Ooi P. A. C., Lim G. S., Teng P. S., 1992. Non-target effects of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) on *Apanteles plutellae* Kurdj., cabbage, sawi and padi. In: Ooi P. A. C., Lim G. S. (eds), *Third International Conference on Plant Protection in the Tropics*, Serdang, Selangor, Malaysia, 20-23 March 1990, Malaysian Plant Protection Society. p. 108-110.
- 136 Lu F. M., Lee H. S., 1984. Observations of the life history of diamondback moth *Plutella xylostella* (L.) in whole year. *Journal of Agricultural Research of China* 33: 424-430.

- 137 **Maa C. J., 1986.** Ecological approach to male diamondback moth response to sex pheromone. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth Management: Proceedings of the first International Workshop*, Tainan, Taiwan, 11-15 March 1985, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 109-123.
- 138 **Mackauer M., 1990.** Host discrimination and larval competition in solitary endoparasitoids (chap. 3). In: Mackauer M., Ehler L. E., Roland J. (eds), *Critical issues in biological control*. Intercept, Andover, UK. p. 41-62.
- 139 **Magallona E. D., 1986.** Development in Diamondback moth Management in the Philippines. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth Management: Proceedings of the first International Workshop*, Tainan, Taiwan, 11-15 March 1985, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 423-435.
- 140 **Malakoff D., 1999.** Fighting fire with fire. *Science* **285**: 1841-1843.
- 141 **Maltais P. M., Nuckle J. R., Leblanc P. V., 1998.** Economic threshold for three lepidopterous larval pests of fresh-market cabbage in Southeastern New Brunswick. *Journal of Economic Entomology* **91**: 699-707.
- 142 **Mason W. R. M., 1981.** The polyphyletic nature of *Apanteles* Foerster (Hymenoptera: Braconidae): a phylogeny and reclassification of Microgastrinae. *Memoirs of the Entomological Society of Canada* **115**: 1-147.
- 143 **Mason J. M., Wright D. J., 1997.** Entomopathogenic nematodes against foliage feeding crucifer pests in the tropics. In: Sivapragasam A., Loke W. H., Hussan A. K., Lim G. S. (eds), *The Management of Diamondback moth and other crucifer pests: Proceedings of the third International Workshop*, Kuala Lumpur, Malaysia, 29 October-1 November 1996, Malaysian Agricultural Research and Development Institute (MARDI) & Malaysian Plant Protection Society. p. 328-331.
- 144 **McCullagh P., Nelder J. A., 1989.** *Generalized linear models*. 2nd edition. Chapman & Hall, London. 511 p.
- 145 **McGaughey W. H., 1985.** Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* **229**: 193-195.
- 146 **McGaughey W. H., Beeman R. W., 1988.** Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of indianmeal moth and almond moth (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology* **81**: 28-33.

- 147 **McGaughey W. H., Whalon M. E., 1992.** Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Science* **258**: 1451-1455.
- 148 **McHugh J. J., Foster R. E., 1995.** Reduction of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) infestation in head cabbage by overhead irrigation. *Journal of Economic Entomology* **88**: 162-168.
- 149 **Mitchell E. R., Hu G. Y., Okine J. S., Carpenter J. E., 1999.** Parasitism of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) larvae by *Cotesia plutellae* (Hymenoptera: Braconidae) and *Diadegma insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae) in cabbage fields after inundative releases of *C. plutellae*. *Journal of Entomological Science* **34**: 101-112.
- 150 **Miyata T., Saito T., Noppun V., 1986.** Studies on the mechanism of diamondback moth resistance to insecticides. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth Management: Proceedings of the first International Workshop*, Tainan, Taiwan, 11-15 March 1985, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 347-357.
- 151 **Mo T. T., 1959.** Hasil pertjobaan dengan insektisida jang mengandung persenjawaan fosfor terhadap *Plutella maculipennis* (Curt.) di Lembang (Bandung) jang resiten terhadap DDT, BHC, DSB. (Results of tests of phosphorus insecticides against chlorinated insecticides resistant *Plutella maculipennis* (Curt.) in Lembang (West Java)). *Contributions in general and agricultural Research of the State of Bogor* **155**: 3-11.
- 152 **Monnerat R. G., 1995.** Interrelations entre la Teigne des Crucifères *Plutella xylostella* (L.) (Lep: Yponomeutidae), son parasitoïde *Diadegma* sp. (Hym: Ichneumonidae) et la bactérie entomopathogène *Bacillus thuringiensis* Berliner. Thèse. Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie, Montpellier. 162 p.
- 153 **de Moraes C. M., Lewis W. J., Paré P. W., Alborn H. T., Tumlinson J. H., 1998.** Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. *Nature* **393**: 570-573.
- 154 **Morillo-Rejesus B., 1986.** Botanical insecticides against the diamondback moth. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth Management: Proceedings of the first International Workshop*, Tainan, Taiwan, 11-15 March 1985, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 241-255.

- 155 **Moriuti S., 1986.** Taxonomic notes on the diamondback moth. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth Management: Proceedings of the first International Workshop*, Tainan, Taiwan, 11-15 March 1985, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 83-88.
- 156 **Muhamad O., Tsukuda R., Oki Y., Fujisaki K., Nakasuji F., 1994.** Influences of wild crucifers on life history traits and flight ability of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Researches in Population Ecology* **36**: 53-62.
- 157 **Murphy R. W., Sites J. W., Buth D. G., Haufler C. H., 1996.** Proteins: Isozyme electrophoresis (chap. 4). In: Hillis D. H., Moritz C., Mable B. K. (eds), *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. p. 51-120.
- 158 **Mushtaque M., Mohyuddin A. I., 1987.** *Apanteles plutellae* Kurdj. (Braconidae: Hymenoptera), an effective parasite of diamondback moth, in Pakistan. *Pakistan Journal of Zoology* **19**: 341-348.
- 159 **Mustata G., 1992.** Role of parasitoid complex in limiting the population of diamondback moth in Moldavia, Romania. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth and other crucifer pests: Proceedings of the second International Workshop*, Tainan, Taiwan, 10-14 December 1990, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 203-211.
- 160 **Nahif A. A., Jungen C., 1998.** Morphology and development of *Vairimorpha* spec. (Microsporidia, Nosematidae) from diamondback moth *Plutella xylostella* (Lep., Yponomeutidae). *Journal of Applied Entomology* **122**: 617-621.
- 161 **Nakahara L. M., McHugh J. J., Otsuka C. K., Funasaki G. Y., Lai P. V., 1986.** Integrated control of diamondback moth and other insect pests using an overhead sprinkler system, an insecticide, and biological control agents, on a watercress farm in Hawaii. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth Management: Proceedings of the first International Workshop*, Tainan, Taiwan, 11-15 March 1985, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 403-413.
- 162 **Nemoto H., 1986.** Factors inducing resurgence in the diamondback moth after application of methomyl. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth Management: Proceedings of the first International Workshop*, Tainan, Taiwan, 11-15 March 1985, Asian vegetable Research and Development Center. p. 387-394.

- 163 NOAA, 1998. *Monthly Climatic Data for the World*. National Oceanographic and Atmospheric Administration, National Climatic Data Center, Ashville. Volume 51.
- 164 Norton W. N., Vinson S. B., 1977. Encapsulation of a parasitoid egg within its habitual host: an ultrastructural investigation. *Journal of Invertebrate Pathology* 30: 55-67.
- 165 Oh M. R., Kim S. S., Park J. D., Paik J. C., Kim D. I., 1997. Biological characteristics of *Cotesia plutellae* (Hymenoptera: Braconidae), a larval parasitoid of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Korean Journal of Entomology* 27: 79-84.
- 166 Ohbayashi N., Shimizu K., Nagata K., 1992. Control of diamondback moth using synthetic sex pheromones. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth and other crucifer pests: Proceedings of the second International Workshop*, Tainan, Taiwan, 10-14 December, 1990, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 99-108.
- 167 Omar D., Mamat M. J., 1997. The feasibility of using sterile insect technique for the control of diamondback moth on cabbage in Cameron Highlands. In: Sivapragasam A., Loke W. H., Hussan A. K., Lim G. S. (eds), *The Management of Diamondback moth and other crucifer pests: Proceedings of the third International Workshop*, Kuala Lumpur, Malaysia, 29 October-1 November 1996, Malaysian Agricultural Research and Development Institute (MARDI) & Malaysian Plant Protection Society. p. 130-133.
- 168 Ooi P. A. C., 1986. Diamondback moth in Malaysia. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth Management: Proceedings of the first International Workshop*, Tainan, Taiwan, 11-15 March 1985, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 35-41.
- 169 Ooi P. A. C., 1988. Laboratory studies of *Tetrastichus sokolowskii*. *Entomophaga* 33: 145-152.
- 170 Ooi P. A. C., 1997. Bringing science to farmers: experiences in integrated diamondback moth management. In: Sivapragasam A., Loke W. H., Hussan A. K., Lim G. S. (eds), *The Management of Diamondback moth and other crucifer pests: Proceedings of the third International Workshop*, Kuala Lumpur, Malaysia, 29 October-1 November 1996, Malaysian Agricultural Research and Development Institute (MARDI) & Malaysian Plant Protection Society. p. 25-33.

- 171 **Ortiz F. M., Blanco J. B., Jiron H. P., 1999.** Cria de *Plutella xylostella* para multiplicacion de suas parasitoides. *Manejo Integrado de Plagas* **51**: 78-81.
- 172 **Ovalle O., Cave R., 1989.** Determinacion de resistencia de *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) a insecticidas comunes en Honduras. *Ceiba* **30**: 119-127.
- 173 **Pak G. A., 1992.** Inundative release of *Trichogramma* for the control of cruciferous Lepidoptera: preintroductory selection of an effective parasitoid. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth and other crucifers pests: Proceedings of the second International Workshop*, Tainan, Taiwan, 10-14 December 1990, Asian vegetable Research and Development Center. p. 297-308.
- 174 **Park T. S., Koh S. J., Lim S. O., Hyon S. W., Song C. H., 1993.** Studies on ecological characteristics of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.), in Cheju Island. *RDA Journal of Agricultural Science, Crop Protection* **35**: 364-370.
- 175 **Pell J. K., Wilding N., Player A. L., Clark S. J., 1993.** Selection of an isolate of *Zygomycetes* (Zygomycetes: Entomophthorales) for biocontrol of the diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. **61**: 75-80.
- 176 **Perera D. R., Armstrong G., Senanayake N., 2000.** Effect of antifeedants on the diamondback moth (*Plutella xylostella*) and its parasitoid *Cotesia plutellae*. *Pest Management Science* **56**: 486-490.
- 177 **Pichon A., 1999.** Caractérisation biologique et génétique de cinq populations d'origines géographiques différentes de *Plutella xylostella* (L.), Lepidoptera Yponomeutidae. Université de Rennes I, Rennes. 27 p.
- 178 **Pintureau B., Babault M., 1988.** Systématique des espèces africaines des genres *Trichogramma* Westwood et *Trichogrammatoidea* Girault (Hym. Trichogrammatidae). In: Voegelé J., Waage J., van Lenteren J. (eds), *Trichogramma and others eggs parasites: second International Symposium*, Guangzhou, China, 10-15 November 1986, INRA. p. 97-120.
- 179 **Poirié M., Frey F., Hita M., Huguet E., Lemeunier F., Periquet G., Carton Y., 2000.** *Drosophila* resistance genes to parasitoids: chromosomal location and linkage analysis. *Proceedings of the Royal Society of London, series B* **267**: 1417-1421.

- 180 **Potting R. P. J., Poppy G. M., Schuler T. H., 1999.** The role of volatiles from cruciferous plants and pre-flight experience in the foraging behaviour of the specialist parasitoid *Cotesia plutellae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **93**: 87-95.
- 181 **Putnam L. G., 1973.** Effects of the larval parasites *Diadegma insularis* and *Microplitis plutellae* on the abundance of the diamondback moth in Saskatchewan rape and mustard crops. *Canadian Journal of Plant Science* **53**: 911-914.
- 182 **Quicke D. L. J., 1997.** *Parasitic wasps*. Chapman & Hall, London. 470 p.
- 183 **Raimondo F. M., 1997.** Les membres italiens du complexe de *Brassica oleracea*: leur distribution et spécificités écologiques. *Boccone* **7**: 103-106.
- 184 **Raju S., 1996.** An overview of insecticide resistance in *Plutella xylostella* L. in India. <http://www.msstate.edu/Entomology/v8n1/art04.html>.
- 185 **Ramachandran S., Buntin G. D., All J. N., Raymer P. L., 1998.** Diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance of *Brassica napus* and *B. oleracea* lines with differing leaf characteristics. *Journal of Economic Entomology* **91**: 987-992.
- 186 **Ramachandran S., Buntin G. D., All J. N., Tabashnik B. E., Raymer P. L., Adang M. J., Pulliam D. A., Stewart C. N., 1998.** Survival, development, and oviposition of resistant diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) on transgenic canola producing a *Bacillus thuringiensis* toxin. *Journal of Economic Entomology* **91**: 1239-1244.
- 187 **Ratter J. A., Ribeiro J. F., Bridgewater S., 1997.** The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Annals of Botany* **80**: 223-230.
- 188 **Reddy G. V. P., Urs K. C. D., 1997.** Mass trapping of diamondback moth *Plutella xylostella* in cabbage fields using synthetic sex pheromones. *International Pest Control* **39**: 125-126.
- 189 **Riethmacher G. W., Rombasch M. C., Kranz J., 1992.** Epizootics of *Pandora blunckii* and *Zoophtora radicans* (Entomophthoraceae: Zygomycotina) in diamondback moth populations in the Philippines. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth and other crucifer pests: Proceedings of the second International Workshop*, Tainan, Taiwan, 10-14 December 1990, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 193-199.

- 190 **Rigaud T., Rousset R., 1996.** What generates the diversity of *Wolbachia*-arthropods interactions ? *Biodiversity and Conservation* **5**: 999-1013.
- 191 **Rizki R. M., Rizki T. M., 1984.** Selective destruction of a host blood cell type by a parasitoid wasp. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **81**: 6154-6158.
- 192 **Rizki R. M., Rizki T. M., 1990.** Parasitoid virus-like particles destroy *Drosophila* cellular immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **87**: 8388-8392.
- 193 **Robertson P. L., 1939.** Diamond-back moth investigation in New Zealand. *New Zealand Journal of Science and Technology* **20**: 330A-364A.
- 194 **Rotheram S., 1967.** Immune surface of eggs of a parasitic insect. *Nature* **214**: 700.
- 195 **Rotheram S., 1973a.** The surface of the egg of a parasitic insect. I. The surface of the egg and first-instar of *Nemeritis*. *Proceedings of the Royal Society of London, series B* **183**: 179-194.
- 196 **Rotheram S., 1973b.** The surface of the egg of a parasitic insect II. The ultrastructure of the particulate coat on the egg of *Nemeritis*. *Proceedings of the Royal Society of London, series B* **183**: 195-204.
- 197 **Rushtapakornchai W., Vattanatangum A., 1986.** Present status of insecticidal control of diamondback moth in Thailand. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth Management: Proceedings of the first International Workshop*, Tainan, Taiwan, 11-15 March 1985, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 307-312.
- 198 **Russo J., Dupas S., Frey F., Carton Y., Brehelin M., 1996.** Insect immunity: early events in the encapsulation process of parasitoid (*Leptopilina boulardi*) eggs in resistant and susceptible strains of *Drosophila*. *Parasitology* **112**: 135-142.
- 199 **Sakanoshita A., Ohta M., Uematsu H., 1987.** Comparative study of ovogenesis in the parasitoids of the diamondback moth *Plutella xylostella*. *Proceedings of the Association for Plant Protection of Kyushu* 139-141.
- 200 **Salinas P. J., 1984.** Studies on the behaviour of the larvae of *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae), a world pest of cruciferous crops. Normal and "spacing" behaviour. *Turrialba* **34**: 77-84.

- 201 **Salinas P. J., 1986a.** Studies on diamondback moth in Venezuela with reference to other Latinoamerican countries. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth Management: Proceedings of the first International Workshop*, Tainan, Taiwan, 11-15 March 1985, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 17-24.
- 202 **Salinas P. J., 1986b.** Ecologia de la popilla del repollo, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). II. Ciclo de vida. *Turrialba* **36**: 130-134.
- 203 **Salt G., 1963.** The defence reactions of insects to metazoan parasites. *Parasitology* **53**: 527-642.
- 204 **Salt G., 1968.** The resistance of insect parasitoids to the defence reactions of their hosts. *Biological Reviews* **43**: 200-232.
- 205 **Sanchis V., Chaufaux J., Lereclus D., 1995.** Utilisation de *Bacillus thuringiensis* en protection des cultures et résistance des insectes. *Cahiers Agricultures* **4**: 405-416.
- 206 **Sastrodihardjo S., 1986.** Diamondback moth in Indonesia. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth Management: Proceedings of the first International Workshop*, Tainan, Taiwan, 11-15 March 1985, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 35-41.
- 207 **Sato Y., Tagawa J., Hidaka T., 1986.** Effects of the gregarious parasitoids, *Apanteles ruficrus* and *A. kariyai*, on host growth and development. *Journal of Insect Physiology* **32**: 281-286.
- 208 **Savary S., Beckage N., Tan F., Periquet G., Drezen J. M., 1997.** Excision of the polydnavirus chromosomal integrated EP1 sequence of the parasitoid wasp *Cotesia congregata* (Braconidae, Microgastrinae) at potential recombinase binding sites. *Journal of General Virology* **78**: 3125-3134.
- 209 **Schellhorn N. A., Sork V. L., 1997.** The impact of weed diversity on insect population dynamics and crop yield in collards, *Brassica oleraceae* (Brassicaceae). *Oecologia* **111**: 233-240.
- 210 **Schepers E. J., Dahlman D. L., Zhang D., 1998.** *Microplitis croceipes* teratocytes: *in vivo* culture and biological activity of teratocyte secreted protein. *Journal of Insect Physiology* **44**: 767-777.

- 211 **Schmutterer H., 1992.** Control of diamondback moth by application of neem extracts. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth and other crucifers pests: Proceedings of the second International Workshop*, Tainan, Taiwan, 10-14 December 1990, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 325-332.
- 212 **Schuler T. H., Poppy G. M., Kerry B. R., Denholm I., 1998.** Insect-resistant transgenic plants. *Trends in Biotechnology* **16**: 1678-175.
- 213 **Shelby K. S., Webb B. A., 1997.** Polydnavirus infection inhibits translation of specific growth-associated host proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **27**: 263-270.
- 214 **Shelby K. S., Webb B. A., 1999.** Polydnavirus-mediated suppression of insect immunity. *Journal of Insect Physiology* **45**: 507-514.
- 215 **Shelton A. M., Sears M. K., Wyman J. A., Quick T. C., 1983.** Comparison of action thresholds for lepidopterous larvae on fresh-market cabbage. *Journal of Economic Entomology* **76**: 196-199.
- 216 **Shelton A. M., Wyman J. A., 1992.** Insecticide resistance of diamondback moth in North America. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth and other crucifer pests: Proceedings of the second International Workshop*, Tainan, Taiwan, 10-14 December 1990, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 447-454.
- 217 **Shelton A. M., Wyman J. A., Cushing N. L., Apfelbeck K., Dennehy T. J., Mahr S. E. R., Eigenbrode S. D., 1993.** Insecticide resistance of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) in North America. *Journal of Economic Entomology* **86**: 11-19.
- 218 **Shelton A. M., Kroening M. K., Eigenbrode S. D., Petzold C., Hoffmann M. P., Wyman J. A., Wilsey W. T., Cooley R. J., Pedersen L. H., 1996.** Diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) contamination of cabbage transplants and the potential for insecticide resistance problems. *Journal of Entomological Science* **31**: 347-354.
- 219 **Shi Z.-H., Liu S.-S., 1998.** Host age preference and suitability of *Cotesia plutellae* Kurdj. *Journal of Zhejiang Agricultural University* **24**: 381-386.

- 220 **Shimabuku R. S., Mau R. F. L., Gusumuka-Minuto L., 1997.** Diamondback moth: feeding preference among commercial varieties of head cabbage. In: Sivapragasam A., Loke W. H., Hussan A. K., Lim G. S. (eds), *The Management of Diamondback moth and other crucifer pests: Proceedings of the third International Workshop*, Kuala Lumpur, Malaysia, 29 October-1 November 1996, Malaysian Agricultural Research and Development Institute (MARDI) & Malaysian Plant Protection Society. p. 295-297.
- 221 **Slade R., 1945.** A new british insecticide. The *gamma* isomer of benzene hexachloride. *Chemical Trade Journal* **116**: 279-281.
- 222 **Smith D. B., Sears M. K., 1982.** Evidence for dispersal of diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae), into Southern Ontario. *Proceedings of the Entomological Society of Ontario* **113**: 21-27.
- 223 **Smith D. B., Sears M. K., 1984.** Life history of *Plutella porrectella*, a relative of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *The Canadian Entomologist* **116**: 913-917.
- 224 **Smith T. J., Villet M. H., 1999.** Parasitoids wasps associated with the diamondback moth, *Plutella xylostella*, in the Grahamstown area of the Eastern Cape. In: van Renburg J. B. J. , van den Berg J. (eds), *Proceedings of the twelfth Entomological Congress*, Potchefstroom, 12-15 July 1999, Entomological Society of Southern Africa. p. 110.
- 225 **Soller M., Lanzrein B., 1996.** Polydnavirus and venom of the egg-larval parasitoid *Chelonus inanitus* (Braconidae) induce developmental arrest in the prepupa of its host *Spodoptera littoralis* (Noctuidae). *Journal of Insect Physiology* **42**: 471-481.
- 226 **Spencer J. L., 1996.** Waxes enhance *Plutella xylostella* oviposition in response to sinigrin and cabbage homogenates. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **81**: 165-173.
- 227 **Stewart C. N., Adang M. J., All J. N., Raymer P. L., Ramachandran S., Parrott W. A., 1996.** Insect control and dosage effect in transgenic canola containing a synthetic *Bacillus thuringiensis* CryIAc gene. *Plant Physiology* **112**: 115-120.

- 228 Stoltz D. B., Vinson S. B., McKinnon E. A., 1976. Baculovirus-like particles in the reproductive tracts of female parasitoids wasps. *Canadian Journal of Microbiology* **22**: 1013-1023.
- 229 Stoltz D. B., Vinson S. B., 1977. Baculovirus-like particles in the reproductive tracts of female parasitoid wasps. II: the genus *Apanteles*. *Canadian Journal of Microbiology* **23**: 28-37.
- 230 Stoltz D. B., Vinson S. B., 1979. Viruses and parasitism in insects. *Advances in Virus Research* **24**: 125-171.
- 231 Stoltz D. B., Krell P. J., Vinson S. B., 1981. Polydisperse viral DNA's in ichneumonid ovaries: a survey. *Canadian Journal of Microbiology* **27**: 123-130.
- 232 Stoltz D. B., Krell P., Summers M. D., Vinson S. B., 1984. Polydnviridae – A proposed family of insect viruses with segmented, double-stranded, circular DNA genomes. *Intervirology* **21**: 1-4.
- 233 Stoltz D. B., Guzo D., Cook D., 1986. Studies on polydnvirus transmission. *Virology* **155**: 120-131.
- 234 Stoltz D. B., Xu D., 1990. Polymorphism in polydnvirus genomes. *Canadian Journal of Microbiology* **36**: 538-543.
- 235 Stoltz D. B., 1990. Evidence for chromosomal transmission of polydnvirus DNA. *Journal of General Virology* **71**: 1051-1056.
- 236 Stoltz D., Whitfield J. B., 1992. Viruses and virus-like entities in the parasitic hymenoptera. *Journal of Hymenopteran Research* **1**: 125-139.
- 237 Stoner K. A., 1992. Resistance and susceptibility to insect pests in glossy genetic lines of *Brassica oleracea* in Connecticut, USA. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth and other crucifer pests: Proceedings of the second International Workshop*, Tainan, Taiwan, 10-14 December 1990, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 57-63.
- 238 Strand M. R., Pech L. L., 1995. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationship. *Annual Review of Entomology* **40**: 31-56.

- 239 Syed A. R., Sivapragasam A., Loke W. H., Fauziah I., 1997. Classical biological control of diamondback moth: the Malaysian experience. In: Sivapragasam A., Loke W. H., Hussan A. K., Lim G. S. (eds), *The Management of Diamondback moth and other crucifer pests: Proceedings of the third International Workshop*, Kuala Lumpur, Malaysia, 29 October-1 November 1996, Malaysian Agricultural Research and Development Institute (MARDI) & Malaysian Plant Protection Society. p. 71-77.
- 240 Tabashnik B. E., Cushing N. L., Marshall W. J., 1987. Diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to insecticides in Hawaii: intra-island variation and cross-resistance. *Journal of Economic Entomology* **80**: 1091-1099.
- 241 Tabashnik B. E., Cushing N. L., Finson N., Johnson M. W., 1990. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Economic Entomology* **83**: 1671-1676.
- 242 Tabashnik B. E., Finson N., Johnson M. W., 1991. Managing resistance to *Bacillus thuringiensis*: lessons from the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Economic entomology* **84**: 49-55.
- 243 Tabashnik B. E., Liu Y. B., Finson N., Masson L., Heckels D. G., 1997. One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **94**: 1640-1644.
- 244 Talekar N. S., Lee S. T., Huang S. W., 1986. Intercropping and modification of irrigation method for the control of diamondback moth. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth Management: Proceedings of the first International Workshop*, Tainan, Taiwan, 11-15 March 1985, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 145-151.
- 245 Talekar N. S., Yang J. C., 1991. Characteristic of parasitism of diamondback moth by two larval parasites. *Entomophaga* **36**: 95-104.
- 246 Talekar N. S., Yang J. C., Lee S. T., 1992. Introduction of *Diadegma semiclausum* to control diamondback moth in Taiwan. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth and other crucifer pests: Proceedings of the second International Workshop*, Tainan, Taiwan, 10-14 December 1990, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 263-270.

- 247 **Talekar N. S., Shelton A. M., 1993.** Biology, ecology, and management of the diamondback moth. *Annual Review of Entomology* **38**: 275-301.
- 248 **Talekar N. S., Lin M. Y., 1998.** *Training manual on IPM of diamondback moth.* Asian Vegetable Research and Development Center, Shanhua, Taiwan. 67 p.
- 249 **Tanaka H., 1992.** Occurrence of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth, and results of trials for integrated control in a watercress greenhouse. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth and other crucifer pests: Proceedings of the second International Workshop*, Tainan, Taiwan, 10-14 December 1990, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 165-173.
- 250 **Tanaka T., 1987.** Calyx and venom fluids of *Apanteles kariyai* (Hymenoptera: Braconidae) as factors that prolong larval period of the host, *Pseudaletia separata* (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of the Entomological Society of America* **80**: 530-533.
- 251 **Tanaka T., Vinson S. B., 1991.** Interaction of venoms with the calyx fluids of three parasitoids, *Cardiochiles nigriceps*, *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae), and *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae) in effecting a delay in the pupation of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of the Entomological Society of America* **84**: 87-92.
- 252 **Tang J. D., Collins H. L., Roush R. T., Metz T. D., Earle E. D., Shelton A. M., 1999.** Survival, weight gain, and oviposition of resistant and susceptible *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) on broccoli expressing Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology* **92**: 47-55.
- 253 **Thaler J. S., 1999.** Jasmonate-inducible plant defences cause increased parasitism of herbivores. *Nature* **399**: 686-688.
- 254 **Thornsteinson A. J., 1953.** The chemotactic responses that determine host specificity in a oligophagous insect (*Plutella maculipennis* (Curt.) Lepidoptera). *Canadian Journal of Zoology* **31**: 52-72.
- 255 **Turlings T. C. J., Tumlinson J. H., Lewis W. J., 1990.** Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science* **250**: 1251-1253.

- 256 Turlings T. C., Loughrin J. H., McCall P. J., Röse U. S. R., Lewis W. J., Tumlinson J. H., 1995. How caterpillars-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 92: 4169-4174.
- 257 Velasco L. R. I., 1982. The life-history of *Apanteles plutellae* Kurdj. (Braconidae), a parasitoid of the diamondback moth. *The Philippines Entomologist* 5: 385-399.
- 258 Verkerk R. H. J., Wright D. J., 1996. Multitrophic interactions and management of the diamondback moth: a review. *Bulletin of Entomological Research* 86: 205-216.
- 259 Vinson S. B., 1970. Development and possible functions of teratocytes in the host-parasite association. *Journal of Invertebrate Pathology* 16: 93-101.
- 260 Vinson S. B., 1971. Defence reaction and hemocytic changes in *Heliothis virescens* in response to its habitual parasitoid *Cardiochiles nigriceps*. *Journal of Invertebrate Pathology* 18: 94-100.
- 261 Vinson S. B., 1972. Effect of the parasitoid, *Campoletis sonorensis*, on the growth of its host, *Heliothis virescens*. *Journal of Insect Physiology* 18: 1509-1514.
- 262 Vinson S. B., Iwantsch G. F., 1980. Host regulation by insect parasitoids. *Quarterly Review of Biology* 55: 143-165.
- 263 Vinson S. B., Hegazi E. M., 1998. A possible mechanism for the physiological suppression of conspecific eggs and larvae following superparasitism by solitary endoparasitoids. *Journal of Insect Physiology* 44: 703-712.
- 264 Volkoff A. N., 1999. Les polydnavirus: vecteurs de transfert d'informations génétiques entre un hyménoptère et un lépidoptère. *Virologie* 3: 23-34.
- 265 Waage J., Greathead D. (eds), 1986. *Insects parasitoids*. Academic Press, London. 389 p.
- 266 Waage J., Cherry A., 1992. Quantifying the impact of parasitoids on diamondback moth. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth and other crucifer pests: Proceedings of the second International Workshop*, Tainan, Taiwan, 10-14 December 1990, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 245-253.

- 267 **Wajnberg E., Hassan S. A. (eds), 1994.** *Biological control with egg parasitoids*. CAB International, Wallingford, UK. 286 p.
- 268 **Wakisaka S., Tsukuda R., Nakasuji F., 1992.** Effects of natural enemies, rainfall, temperature and host plants on survival and reproduction of the diamondback moth. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth and others crucifer pests: Proceedings of the second International Workshop*, Tainan, Taiwan, 10-14 December 1990, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 15-26.
- 269 **Waladde S. M., Villet M. H., Leutle M. F., 1999.** Parasitism on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae): observations in the Eastern Cape Province, South Africa. In: van Rensburg J. B. J., van den Berg J. (eds), *Proceedings of the twelfth Entomological Congress*, Potchefstroom, 12-15 July 1999, Entomological Society of Southern Africa. p. 135.
- 270 **Walker H. G., Anderson L. D., 1934.** Notes on the use of derris and pyrethrum dusts for the control of certain insects attacking cruciferous crops. *Journal of Economic Entomology* **27**: 388-393.
- 271 **Waterhouse D. F., Norris K. R., 1987.** *Plutella xylostella* (Linnaeus) (chap. 22). In: The Australian Center for International Agricultural Research (ACIAR) (ed.), *Biological control: Pacific prospects*. Inkata Press, Melbourne. p. 177-191.
- 272 **Waterhouse D. F., 1992.** Biological control of diamondback moth in the Pacific. In: Talekar N. S. (ed.), *Diamondback moth and other crucifer pests: Proceedings of the second International Workshop*, Tainan, Taiwan, 10-14 December 1990, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 213-224.
- 273 **Whitfield J. B., 1997.** Molecular and morphological data suggest a single origin of the polydnviruses among braconid wasps. *Naturwissenschaften* **84**: 502-507.
- 274 **Wilding N., 1986.** The pathogens of diamondback moth and their potential for its control - a review. In: Talekar N., *Diamondback moth Management: Proceedings of the first International Workshop*, 11-15 March 1985, Tainan, Taiwan, Asian Vegetable Research and Development Center. p. 219-232.
- 275 **Wilkinson D. S., 1939.** On two species of *Apanteles* (Hym. Brac.) not previously recognised from the Western Palearctic Region. *Bulletin of Entomological Research* **30**: 77-84.

- 276 **Wright D. J., Iqbal M., Verkerk R. H. J., 1995.** Resistance to *Bacillus thuringiensis* and abamectin in the diamondback moth, *Plutella xylostella*: a major problem for integrated pest management ? *Mededelingen-Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, Universiteit Gent* **60**: 927-933.
- 277 **Wright D. J., Iqbal M., Granero F., Ferre J., 1997.** Resistance mechanisms to *Bacillus thuringiensis* subspp. *kurstaki* and *aizawai* in a multi-resistant field population of *Plutella xylostella* from Malaysia. In: Sivapragasam A., Loke W. H., Hussan A. K., Lim G. S. (eds), *The Management of Diamondback moth and other crucifer pests: Proceedings of the third International Workshop*, Kuala Lumpur, Malaysia, 29 October-1 November 1996, Malaysian Agricultural Research and Development Institute (MARDI) & Malaysian Plant Protection Society. p. 206-210.
- 278 **Xu D., Stoltz D. B., 1991.** Evidence for a chromosomal location of polydnavirus DNA in the ichneumonid parasitoid *Hyposoter fugitivus*. *Journal of Virology* **65**: 6693-6704.
- 279 **Zeven A. C., de Wet J. M. J., 1982.** *Dictionary of cultivated plants and their regions of diversity*. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, Holland. 264 p.
- 280 **Zilahi-Balogh G. M. G., Angerilli N. P. D., Borden J. H., Meray M., Tulung M., Sembel D., 1995.** Regional differences in pheromone responses of diamondback moth in Indonesia. *International Journal of Pest Management* **41**: 201-204.

ANNEXES



1 - STATISTIQUES

Comparaison des taux de parasitisme des différents stades larvaires à l'aide d'un modèle log-linéaire

Principe

Pour déterminer s'il existe une préférence des parasitoïdes pour un stade larvaire de *Plutella xylostella* ou un autre, on compare les proportions d'individus parasités dans chaque stade à partir des chiffres fournis par les échantillonnages.

Les relevés s'étalant dans le temps et concernant deux parcelles à chaque fois, une simple comparaison χ^2 (chi2) des résultats totaux (groupant les valeurs de toutes les semaines réunies) ne peut convenir et il est nécessaire de passer à un modèle log-linéaire.

Pour démontrer l'inefficacité du test du χ^2 dans ce cas, prenons l'exemple suivant :

- Nous disposons de deux échantillonnages totaux de taille égale en deux lieux, avec des chenilles attaquées par un parasitoïde qui occasionne donc un certain taux de parasitisme sur chaque parcelle, indépendamment l'une de l'autre :

Lieu A) Le taux de parasitisme observé est de 25 % sur 100 chenilles collectées, réparties à raison de 20, 20 et 60 individus pour les stades L2, L3 et L4 respectivement.

Le tableau de contingence de l'échantillonnage est donc :

Stade	L2	L3	L4
Chenilles parasitées	5	5	15
Chenilles saines	15	15	45
Total	20	20	60

et le χ^2 est nul puisque la proportion chenilles parasitées / chenilles saines ne varie pas d'un stade à l'autre.

Lieu B) Le taux de parasitisme est ici de 75 % sur 100 autres chenilles collectées, réparties à raison de 60, 20 et 20 pour les stades L2, L3 et L4 respectivement.

Le tableau de contingence de l'échantillonnage est donc :

Stade	L2	L3	L4
Chenilles parasitées	45	15	15
Chenilles saines	15	5	5
Total	60	20	20

Le χ^2 est encore égal à 0 car il n'y a pas là non plus d'augmentation d'un stade au suivant.

Maintenant étudions la somme des comptages sur les deux parcelles pour étudier de façon plus globale notre parasitoïde.

Nous obtenons alors le tableau de contingence suivant :

	L2	L3	L4
Chenilles parasitées	50	20	30
Chenilles saines	30	20	50
Total	80	40	80

On observe maintenant des variations dans le taux de parasitisme. Pour vérifier si elles s'avèrent significatives, on recalcule le χ^2 de ce tableau, tout en sachant que dans le cadre d'une évolution indépendante des parcelles nous aurions dû observer les effectifs théoriques :

	L2	L3	L4
Chenilles parasitées	40	20	40
Chenilles saines	40	20	40
Total	80	40	80

Pour chaque case, le χ^2 se calcule comme (écart entre l'effectif observé et effectif théorique)² divisé par l'effectif théorique et on additionne le résultat des six cases (3 stades larvaires étudiés pour chacune des deux parcelles). Pour le tableau 3 on calcule donc :

$$\begin{aligned}\chi^2 &= (50-40)^2/40 + (20-20)^2/20 + (30-40)^2/40 + (30-40)^2/40 + (20-20)^2/20 + (50-40)^2/40 \\ &= 2,5 + 0 + 2,5 + 2,5 + 0 + 2,5 = 10\end{aligned}$$

En sachant que l'on a deux degrés de liberté et que la valeur limite de significativité à 5 % est alors de 5,99, on a ici un χ^2 très supérieur et une variation du taux de parasitisme qui s'avère significative ($p < 0.007$) alors qu'il n'y avait aucune différence dans chaque parcelle prise séparément.

Le mélange de relevés où les taux de parasitisme sont variables et où les effectifs de chaque stade larvaire de l'hôte sont eux-mêmes variables mènent donc à des conclusions erronées.

La solution est alors de passer à une méthode de calcul plus sophistiquée, capable de prendre en compte ces variations d'échantillonnages et de taux de parasitisme et en l'occurrence il s'agit du modèle log-linéaire, plus complexe cependant à interpréter (McCullagh & Nelder, 1989).

Parmi les variables prises en compte par ce modèle, c'est l'interaction état*stade qui nous intéresse car c'est à partir des résultats des calculs sur cet effet que l'on peut déterminer si les parasitoïdes ont une préférence ou non pour certains stades.

Chaque taux de parasitisme est exprimé sous forme d'une cote, qui est le rapport entre la proportion d'individus sains et la proportion d'individus parasités. Un taux de parasitisme de 75 % - donc 25 % d'individus sains - correspond ainsi à une cote de 1 contre 3 [25/75]. Plus exactement, à partir d'une cote x on calcule le $\log(x)$ (le modèle n'accepte donc aucune valeur nulle) et dans la colonne {cote} on affiche la différence $[\log(x_A) - \log(x_B)]$ où x_B et x_A sont les cotes de deux stades larvaires successifs. Ici on prend la valeur du stade L4 étant égale à 0 et les cotes des stades L2 et L3 sont définies par rapport à ce zéro.

Résultats

Pour les *Diadegma* spp. et *Cotesia plutellae*, la cote est croissante avec le stade larvaire (elle part d'une valeur négative en L2 vers 0 en L4), ce qui signifie que le taux de parasitisme augmente d'un stade à l'autre. Dans le cas d'*Apanteles piceotrichosus*, elle est décroissante, impliquant un taux de parasitisme décroissant d'un stade à l'autre, ce qui est un peu plus problématique mais explicable (voir § III.3.3.2).

Quelle est la correspondance de ces cotes avec le taux de parasitisme et comment calculer ses variations réelles ?

Prenons l'exemple du tableau 3-13 concernant *Diadegma* sp. à la Réunion et admettons que le taux de parasitisme sur le stade L4 soit de 50 % pour simplifier (très proche du taux réel). Il y a donc 50 % de chenilles parasitées et 50 % de chenilles saines, la cote est donc de 50/50 soit $x_1 = 1$. On calcule alors le taux de parasitisme pour les stades L2 et L3 à partir de L4 où la cote est zéro. Pour L3, on calcule donc la cote $x_2 = e^{-0,13} = 0,878$ et le taux de parasitisme est $\{tx\ par\} = x_2/(1 + x_2) = 0,878/1,878 = 0,468$ soit 46,8 %. Pour L2 la cote $x_3 = e^{-0,31} = 0,733$ et $\{tx\ par\} = x_3/(1 + x_3) = 0,733/1,733 = 0,423$ soit 42,3 %.

Pour le Brésil, on peut prendre l'exemple du tableau 3-4 et admettre un taux de parasitisme de 25 % (proche aussi du taux réel). La cote x_A est alors de 3 (75 % d'individus sains contre 25 % de parasités). Pour L3, la cote $x_B = e^{-0,42} = 0,657$ et $\{tx\ par\} = 0,657/(3 + 0,657) = 0,180$ soit 18 %. Pour L2 la cote $x_C = e^{-1,08} = 0,340$ et $\{tx\ par\} = 0,340/(3 + 0,340) = 0,102$ soit 10,2 %.

Concernant le stade L4 de *Cotesia plutellae*, où l'augmentation se révèle non significative, un calcul de la précision des paramètres du modèle montre que l'augmentation en question ne peut être supérieure à 3 % (dans le cas le plus favorable, c'est-à-dire quand le taux de parasitisme est de 50 % comme dans le premier des exemples précédents. Ceci correspond à une région de la courbe représentant la fonction $y = x/(1 + x)$ où la pente de cette courbe est la plus élevée quand x varie de $-\infty$ à $+\infty$).

Or une augmentation de 3 % est insignifiante quand on se trouve comme ici dans des conditions de terrain avec un effectif de parasitoïdes (ayant servi à effectuer les calculs) de 650 individus au total. Le résultat "augmentation non significative" ne permet donc pas de choisir entre l'option {absence d'attaque du stade L4} et l'option {attaque du stade L4 mais moindre que sur L2 et L3}. Par contre on sait que s'il y a attaque elle sera donc inférieure à 3 % et *C. plutellae* a donc une préférence très nette pour les stades L2 et L3.

Autres colonnes du tableau

- {d.d.l} représente le nombre de degrés de liberté du χ^2 de comparaison du stade concerné au stade L4. Pour 1 d.d.l, le χ^2 est significatif au seuil de 5 % quand il dépasse 3,84.
- {l'erreur-type} représente l'incertitude sur la mesure du logarithme de la cote
- la {probabilité} indique la significativité du résultat.

2 – BIOCHIMIE

Ces informations sont tirées du protocole de Hebert & Beaton (1993), détaillant toute la méthodologie nécessaire à l'utilisation de l'électrophorèse sur acétate de cellulose avec le matériel de Helena Labs (éditeur du protocole). D'autres fabricants ont développé leur propre matériel d'électrophorèse mais ce protocole a été conçu uniquement pour celui-là.

2.1 - Tampons de gels et de migration

CAAPM (Citric Acid - AminoPropylMorpholine) - pH = 7,0

Pour un litre de tampon 4X : 42 g d'acide citrique (anhydre)
50 ml de 4-(3-aminopropyl)morpholine

TG (Tris-Glycine) ; pH = 8,5

Pour un litre de tampon 10X : 30 g de "Trizma" base
144 g de Glycine

Egalement disponible "prêt à l'emploi" chez Sigma, par exemple.

2.2 - Tampons de révélation

Ils ne sont pas toujours nécessaires (tampon Tris.HCl), mais peuvent améliorer les résultats pour certains systèmes enzymatiques.

Tris-Maléate 0,1 M, pH 5,3 (pour estérases)

1,2 g de "Tris"

1,2 g d'acide maléique

2,4 ml de NaOH 1M

et compléter à 100 ml avec de l'eau

Tris.HCl pH 7 : 44,4 g de "Tris" + 350 ml de HCl 1M, compléter à 4 l avec de l'eau.

Tris.HCl pH 8 : 44,4 g de "Tris" + 248 ml de HCl 1M, compléter à 4 l avec de l'eau.

Tris.HCl pH 9 : 98,6 g de "Tris" + 120 ml de HCl 1M, compléter à 4 l avec de l'eau.

2.3 - Agar

Il sert à former la couche solide servant de milieu de révélation.

On utilise de l'agar (de qualité bactérienne) à concentration 1,6 %, à conserver en flacon bouché à 60 °C après dissolution. Ajouter quelques ml de cet agar chaud aux solutions de révélation juste avant de couler le mélange sur les plaques de gel.

2.4 - Réactifs pour solutions de révélation

Seuls les réactifs correspondant aux 13 systèmes enzymatiques ayant donné de bons résultats sont précisés ici. Autrement une trentaine de systèmes sont détaillés dans le protocole de Hebert & Beaton (1993), disponible auprès de la société Helena Laboratories (Adresse pour la France : Helena France S.A ; 6, rue Charles Gros ; Z.A.E ; 95320 Saint-Leu-la-Forêt).

Les réactifs en solution sont préparés à partir des composés en poudre, généralement conservés au congélateur à cause de leur fragilité. Ils sont préparés dans des flacons compte-gouttes, une grande précision des volumes n'étant pas nécessaire.

Ces solutions se stockent sans problèmes au réfrigérateur pour des durées pouvant atteindre plusieurs mois. Les substances susceptibles de subir une dégradation bactérienne sont protégées par l'adjonction d'azoture de sodium ("sodium azide", NaN_3) à hauteur de 1 ‰ de solution de NaN_3 à concentration 250 mg/ml (marqué ici par un astérisque *). Les substances photosensibles sont placées dans des flacons ambrés, emballés dans du papier d'aluminium.

Réactif	Concentration (mg/ml)
- Acide cis-aconitique	10 (ajuster à pH 8)
- <i>ortho</i> -dianisidine. diHCl	4
- Fast Red BB ; Fast Red RR	à saturation
- Fructose-6-phosphate *	20
- Glucose-1-phosphate *	100 (mélange 50/50 de grade III et VI)
- D-glucose-6-phosphate *	20
- DL- α -phosphoglycérate (de sodium) *	40
- Acide DL-isocitrique *	100
- Chlorure de magnésium	20
- Chlorure de manganèse	20
- D-mannose-6-phosphate *	20
- MTT	10 (peu soluble - agiter longtemps)
- NAD* et NADP *	2
- Phe-Leu ; Phe-Pro et autres di- ou tripeptides *	10 (ces deux-ci sont très solubles)
- Acide 6-phosphogluconique (sel trisodique) *	20
- PMS	2 (photosensible)

2.5 - Autres réactifs

- **Substrats pour les estérases** : acétate ou propionate d' α ou β -naphthyle

Dissoudre 100 mg de l'un de ces 4 substrats dans un mélange eau/acétone (10 ml + 10 ml).

- "**Substrat malique**" :

Diluer 20 ml de Tris.HCl, pH 9 dans 180 ml eau, puis ajouter 3,7 g d'acide L-malique. Ajuster ensuite le pH de la solution à 8.

- **Enzymes**

- "L-amino-acid oxydase", vendue sous forme de venin desséché de Crotale : à préparer en solution à 10 U/ml, soit environ 20 mg/ml (dépend de l'espèce de serpent utilisée).

- Glucose-6-phosphate deshydrogénase (G6PDH) NAD-dépendante, de *Leuconostoc* (préférable car les autres G6PDH utilisent le cofacteur NADP bien plus onéreux).

A utiliser à 300 unités/ml.

- Isocitrate Deshydrogénase (IDH) : utiliser à une concentration équivalent à 50 U/ml

- PhosphoGlucoIsomérase (PGI) : utiliser à une concentration équivalent à 600 U/ml

- Peroxydase : utiliser à une concentration équivalent à 1 000 U/ml.

On peut aussi récupérer plus économiquement la peroxydase à partir d'extrait de radis (cette enzyme leur donne d'ailleurs leur goût piquant, à cause de la formation d'eau oxygénée en petites quantités dans la bouche) : mélanger 100 mg de poudre de radis séchée ("Horseradish Acetone Powder") avec 0,5 ml d'acétone et 5 ml de tampon phosphate pH 7,4. Broyer pour finir d'extraire l'enzyme et filtrer ou laisser décanter. Cette méthode de récupération a été décrite pour la révélation sur gels d'amidon mais fonctionne très bien avec les gels d'acétate de cellulose.

2.6 - Recettes de révélation

Dans tous les cas les colorants (Fast Red TR, PMS et MTT dans une moindre mesure), photosensibles, et les enzymes, labiles, sont à ajouter extemporanément, suivi de l'agar chaud. Les autres produits peuvent être mélangés un peu à l'avance en conservant le prémélange au réfrigérateur.

Les "ingrédients" des recettes sont à ajouter dans l'ordre décrit ci-dessous :

Aconitase = Aconitate Hydratase

- 16 gouttes d'acide *cis*-aconitique
- 1,5 ml de NADP
- 6 gouttes de MgCl₂
- 5 gouttes de MTT
- 5 gouttes de PMS
- 10 µl d>IDH
- 2 ml d'agar

(Carboxyl) Estérase(s)

- 2 ml de Tris-maléate 0,1 M, pH 5,3
- 200 µl de solution de substrat (acétate d' α -naphtyle, ...)
- 10 gouttes de Fast Red TR à saturation
- 2 ml d'agar

- Remarque : le colorant importe peu en fait : le système accepte le Fast Blue RR ou BB, le Fast Garnet GBC (utilisé dans l'ancienne version du protocole) et probablement d'autres. Les couleurs obtenues changent. Ces enzymes sont très réactives malgré les faibles dimensions de *C. plutellae*.

Phosphoglucoisomerase = Glucose-6-phosphate Isomérase

- 1 ml de Tris.HCl pH 8
- 1,5 ml de NAD
- 5 gouttes de Fructose-6-phosphate
- 5 gouttes de MTT
- 5 gouttes de PMS
- 10 µl de G6PDH
- 2 ml d'agar

Glycerol-3-phosphate Deshydrogénase

- 0,6ml de Tris.HCl pH 8
- 1,5 ml de NAD
- 22 gouttes de DL- α -phosphoglycérate
- 5 gouttes de MTT
- 5 gouttes de PMS
- 2 ml d'agar

Isocitrate Deshydrogénase

- 1 ml de Tris.HCl pH 7
- 1,5 ml de NADP
- 15 gouttes d'acide DL-isocitrique
- 8 gouttes de $MgCl_2$
- 5 gouttes de MTT
- 5 gouttes de PMS
- 2 ml d'agar

Malate Deshydrogénase

- 1 ml de Tris.HCl pH 8
- 1,5 ml de NAD
- 13 gouttes de "substrat malique"

- 5 gouttes de MTT
- 5 gouttes de PMS
- 2 ml d'agar

"Enzyme malique" (NADP⁺-dépendante)

- 0,6 ml de Tris.HCl pH 8
- 1,5 ml de NADP
- 12 gouttes de "substrat malique"
- 2 gouttes de MgCl₂
- 5 gouttes de MTT
- 5 gouttes de PMS
- 2 ml d'agar

Mannose-6-phosphate Isomérase

- 1 ml de Tris.HCl pH 8
- 1,5 ml de NAD
- 5 gouttes de DL-mannose-6-phosphate
- 5 gouttes de MTT
- 5 gouttes de PMS
- 5 µl de PGI
- 20 µl de G6PDH
- 2 ml d'agar

Peptidases

- 2 ml de solution Na₂HPO₄ 0,02 M, pH 7,4
- 4 gouttes de peroxydase (ou extrait de poudre de radis)
- 8 gouttes d'*ortho*-dianisidine.diHCl
- 2 gouttes de MnCl₂
- 8 gouttes du (di)peptide désiré :
 - Phe-Pro
 - Phe-Ala
 - Leu-Gly-Gly
- 4 gouttes de "L-amino-acid oxydase"

Phosphoglucomutase

- 1 ml Tris.HCl pH 8
- 1,5 ml NAD
- 5 gouttes de MgCl₂
- 5 gouttes de glucose-1-phosphate
- 5 gouttes de MTT
- 5 gouttes de PMS
- 20 µl de G6PDH
- 2 ml d'agar

6-Phosphogluconate Deshydrogénase

- 0,6 ml Tris.HCl pH 8
- 1,5 ml NADP
- 6 gouttes d'acide 6-phosphogluconique
- 6 gouttes de $MgCl_2$
- 5 gouttes de MTT
- 5 gouttes de PMS
- 2 ml d'agar

2.7 – Analyses génétiques

Elles sont opérées d'abord avec l'aide du logiciel F-Stat. Les matrices des caractéristiques alléliques présentées dans les tableaux ci-après sont codées sous une forme compréhensible par le logiciel F-Stat (disponible sur demande à l'adresse jerome.goudet@izea.unil.ch). Celui-ci peut alors calculer la distance génétique entre les populations, par différentes séries de calculs dans les populations et entre populations, par locus et pour tous les loci. La distance génétique est exprimée ici à l'aide d'un indice, le F_{st} , compris entre 0 et 1. La valeur nulle correspond à des populations "jumelles", identiques, les valeurs de F_{st} de plus en plus proches de 1 correspondant à des populations de plus en plus distinctes génétiquement. A partir de ces valeurs de F_{st} le logiciel effectue des séries de permutations qui permettent de vérifier si les populations sont significativement différentes.

On peut calculer un F_{st} global, sur les cinq populations testées ici, pour avoir une idée globale de la différenciation des populations, mais il est nécessaire de calculer les F_{st} de toutes les combinaisons possibles de paires de populations si l'on veut connaître leurs relations exactes. Cela correspond ici au calcul de $4 + 3 + 2 + 1$ combinaisons pour cinq populations.

Cette série de valeurs peut être présentée dans une matrice (tableau 4-3 ici) mais ceci ne permet pas d'analyser aisément la différenciation entre les populations. On passe alors à une représentation graphique, sous forme d'un arbre cladistique (ramifications à deux branches uniquement) ou étoilé (ramifications plus complexes possibles, c'est celui de la figure 4-4). Cette représentation étoilée est calculée par un autre logiciel, DARwin 3.5 ici, selon la technique du Neighbor-Joining : un arbre en étoile est d'abord créé (à cinq branches dans notre cas, une branche par population) puis le logiciel cherche à regrouper celles qui lui semblent les plus proches, puis essaie de créer d'autres groupes (pouvant comprendre le premier groupe créé) et ainsi de suite. Dans notre cas d'étude trois branches restent : population du Bénin très distincte, population réunionnaise aussi à part et une branche comprenant les trois autres populations de Taïwan, Afrique du Sud et Hong-Kong qui peuvent être plus facilement rapprochées par leurs fréquences alléliques.

Référence : E. Bousquet, " Représentation arborée d'une dissimilarité à partir d'un indice arboré"
– DEA de Biostatistiques, Université de Montpellier II, 1994.

Caractéristiques alléliques des individus de *Cotesia plutellae* utilisés lors des calculs de
différenciation génétique pour les cinq populations étudiées

Cotesia Réunion					
	Sexe	PGDH	ME	MPI	PEP Phe-Ala
Série 1	f		SS	SS	
	m	F	S	S	S
	m	F	S	S	S
	m	F	S	F	M
Série 2	m	F	F	S	
	m	F	F	S	S
	m	F	F	F	S
	m	F		S	F
Série 3	f	FF	SS	FS	
	f	FF	SS	FS	
	m	F	S	S	F
	m	F	S	S	S
Série 4	m	S	F	S	S
	m	F	S	S	S
	m	S	F	S	S
	m	F	F	F	S
Série 5	f	FF	SS	SS	
	m	F	S	S	S
	m	F	F	F	S
	m	F	S	S	M
Série 6	f	SS	SS	FF	
	f	SS	SS	SS	
	m	S	S	F	F
	m	S	S	S	S
Série 7	m	F	S	S	S
	m	F	S	S	S
	m	F	S	S	S
	m	F	S	S	
Série 8	m	F	S	S	M
	m	F	S	S	S
	m	F	S	S	M
	m	F	S	S	M
Série 9	m		S	S	S
	m	S	S	S	S
	m	S	F	S	F
	m		S	S	S
Série 10	m	F	S	S	F
	m	F	S	S	F
	m	F	S	S	F
	m	F	S	S	S
Additions	m	F	F	S	M
	m	F	F	S	S
	m	F	S	S	F
	m	F	S	S	F
	m	F	S	S	F
	m	F	S	S	M
Nombre d'individus		44	45	46	38
Nombre de bandes		49	51	52	38

Cotesia Bénin

	Sexe	PGDH	ME	MPI	PEP Phe-Ala
Série 1	m	S	S	S	S
	m	S	F	S	S
	m	S		S	S
	m	S	S	S	S
Série 2	m	F		S	
	m	S		S	
	m	S		S	
	f	SS		SS	
Série 3	m	S	S	S	S
	m	S	F	S	F
	m	S	F	S	S
	m	S	F	S	S
Série 4	m	S	S	S	S
	m	S	F	S	S
	m	S	S	S	F
	m	S	F	S	S
Série 5	m	S	S	S	F
	m	S	F	S	F
	m	S	S	S	S
	m	S	F	S	F
Série 6	m	S	F	S	
	m	F	F	S	F
	m	S	F	S	S
	m	S	F	S	F
Série 7	m	S	F	S	F
	m	S	S	S	S
	m	F	F	S	S
	m	F	F	S	S
Série 8	m	S	S	S	F
	m	F	F	S	F
	m	S	F	S	F
	m	S	F	S	S
Série 9	m			S	S
	m			S	S
	m			S	S
	m		F	S	S
Série 10	m	S	F	S	S
	m	F	S	S	S
	m		S	S	S
	m	S	F	S	F
Additions	m	S	F	S	S
	m	S	S	S	S
	m		F	S	S
	m	S	S	S	S
	m		F	S	S
	m		S	S	F
	m	S	F	S	S
	m		F	S	F
Nombre d'individus		39	40	48	43
Nombre de bandes		40	40	49	43

Cotesia Taiwan

	Sexe	PGDH	ME	MPI	PEP Phe-Ala
Série 1	m	F	F	S	V
	m	F	S	S	F
	m		F	S	S
	m	S	F	S	S
Série 2	f	FF	FS	SS	SS
	m	F	S	S	S
	m	F	S	S	M
	f	FF	S	SS	SS
Série 3	f	FF	FS	FS	SS
	m	F	S	S	S
	m	S	F	S	F
	f	FF	FF	SS	SS
Série 4	f	FF	SS	SS	
	f	FF	SS	SS	
	f	FF	SS	FS	
	m	F	S	S	S
Série 5	m	F	S	F	S
	m	S	F	S	S
	m	F	S	F	S
	m	F	S	V	S
Série 6	f	SS	FS	FS	
	m	F	S	S	S
	m	S	S	V	S
	m	S	F	S	S
Série 7	m	S	S	S	S
	m	S	S	S	S
	m	S	S	S	S
	m		F	S	S
Série 8	m	F	F	F	S
	m	F	F	S	S
	m	S	F	S	M
	m	F	F	S	S
Série 9	m		S	S	V
	m	F	S	S	S
	m	S	F	F	F
	m	S	F	S	S
Série 10	m		F	S	S
	m	F	F	S	S
	m	S	F	S	F
	m		S	V	S
Additions	m	S	F	S	S
	m	F	F	S	S
	m	S	S	S	S
	m	F	F	S	M
	m	S	F	S	S
	m	S	S	S	S
	m	F	F	S	S
	m	F	F	V	S
	m	F	S	F	S
	m	F	F	S	V
	m	F	F	S	S
	m	F	S	S	M
	m	F	F	F	S
	m	F	F	V	M
	m	F	F	S	S
	m	F	F	S	S
Nombre d'individus		51	56	56	53
Nombre de bandes		59	63	63	57

Cotesia Hong-Kong

	Sexe	PGDH	ME	MPI	PEP Phe-Ala
Série 1	m	F	F	S	S
	m	F	S	S	S
	m	F	F	S	S
	m	F	F	S	S
	m	F	F	S	S
	m	F	F	S	S
	m	F	F	S	S
	m	F	F	S	S
Série 2	m	F	F	S	S
	m	S	F	S	S
	m	F	F	S	S
	m	F	F	S	S
	m	F	S	S	S
	m	F	F	S	S
	m	F	F	S	S
	m	F	F	S	S
Série 3	f	FF	FF	SS	SS
	f	FS	FS	SS	SS
	m	S	F	S	S
	f	FS	FF	SS	SS
	f	FF	FF	SS	S
	m	F	F	S	S
	m	F	F	S	M
	m	F	F	S	M
Série 4	f	FF	SS	SS	SS
	f	FF	FS	SS	SM
	f	FF	FF	SS	SS
	f	FF	FF	SS	SS
	f	FF	SS	FS	SS
	f	FF	SS	SS	SS
Nombre d'individus		30	30	30	30
Nombre de bandes		40	40	40	40

Cotesia Afrique du Sud

	Sexe	PGDH	ME	MPI	PEP Phe-Ala
Série 1	m	F	F	S	S
	m	F	F	S	S
	m	S	F	S	S
	m	S	F	S	S
	m	S	F	S	S
Série 2	m	F	F	S	S
	m	F	F	S	S
	m	F	F	S	S
	m	F	F	S	S
	m	F	F	S	S
Série 3	m	F	F	S	S
	m	F	F	S	S
	m	F	F	S	S
	m	F	F	S	S
	m	F	F	S	S
Série 4	m	F	F	S	S
	m	F	F	S	S
	m	F	F	S	S
	m	F	F	S	S
	m	F	F	S	S
Série 5	m	F	F	S	S
	m	F	F	S	S
	m	F	F	S	S
	m	F	F	S	S
	m	F	F	S	S
Série 6	m	F	F	S	S
	m	F	F	S	S
	m	F	F	S	S
	m	S	S	S	M
	m	F	F	S	S
Série 7	m	F	F	S	S
	m	F	F	S	S
	m	S	F	S	S
	m	F	F	S	S
	m	F	F	S	S
Série 8	m	F	F	S	S
	m	F	F	S	S
	m	F	F	S	S
	m	F	F	S	S
	m	F	F	S	S
Nombre d'individus		40	40	40	40
Nombre de bandes		40	40	40	40

3 - MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Protocole de fixation des ovaires

Les réactifs utilisés proviennent de la société TAAB (TAAB Laboratories Equipment Ltd. – Unit 3 Minerva House, Calleva Ind. Park, Aldermaston ; Reading Berks RG7 4 QW).

3.1 : Fixation et inclusion des échantillons

Produits utilisés	Durée du traitement
- Paraformaldéhyde 4 % + Glutaraldéhyde 2 % dans tampon cacodylate 0,1 M à pH 7,1	4 heures
- Tampon cacodylate 0,1 M à pH 7,1	3 x 20 minutes
- Tétroxyde d'osmium à 1 %	1 heure
- Eau pure (18 M Ω /cm)	3 x 20 minutes
- Ethanol à 10 %	1 heure
- Ethanol à 30 %	1 heure
- Ethanol à 50 %	1 heure
- Ethanol à 70 %	1 heure
- Ethanol à 90 %	2 x 1 heure
- Ethanol absolu	2 x 1 heure
- Résine Epon 812 / éthanol absolu : 1/1	2 h 30
- Résine / éthanol : 3/1	1 nuit
- Résine pure	1 h 30 puis 3 h dont 30 min au dessiccateur

Puis dépôt dans les moules, et durcissement par passage à l'étuve : 1 nuit à 56 °C.

Remarques :

Le traitement, long, peut être stoppé après le bain dans l'éthanol à 70 %, les échantillons pouvant alors être stockés plusieurs jours en cas de besoin. Autrement, les séries d'étapes antérieure et postérieure à cette phase doivent être menées sans interruption.

Les durées peuvent être ajustées en fonction de la taille des échantillons :

- Les ovaires de Braconidés sont petits, mous et sont facilement imprégnés par les produits. On peut réduire les temps de préparation.

- Par contre les abdomens de nymphes, à cuticule peu perméable, nécessitent une préfixation, puis doivent être redécoupés en fragments plus petits pour que les réactifs puissent pénétrer dans l'hémocèle ; les durées des différentes étapes peuvent être doublées par

précaution. Initialement un mélange contenant seulement 0,05 % de glutaraldéhyde a été employé pour limiter la contraction des tissus mous, et a donné de bons résultats. Mais par la suite le mélange à 2 %, plus classique et mieux maîtrisé, a été employé. L'inclusion de polydnavirus pour observations au MET semble rarement réalisée et il n'y a pas de consensus sur une technique donnée parmi les protocoles décrits dans les articles.

Quoique la concentration notée ici ait donné de bons résultats, l'utilisation de solutions de tétroxyde d'osmium à 1,5 voire 2 % pourrait améliorer la qualité des fixations et de l'image finale résultante, principalement pour la visualisation des mitochondries, même si elles ne sont pas l'objet de l'observation (Gargani, comm. pers.).

3.2 : Préparation des coupes

Découpe au microtome à couteau de verre pour les coupes semi-fines (épaisseur \approx 500 nm), utilisées pour le repérage des zones les plus intéressantes. Pour la photographie, on passe aux coupes fines (épaisseur \approx 100 nm), par coupe à l'aide de lames de diamant.

Puis dépôt de ces coupes sur des grilles.

Double coloration : Citrate de plomb (10-40 mg/ml ; 3 min) puis acétate d'uranyle 5 % (45 min).

Observations au MET, grossissements \times 5 000 à \times 40 000.

4 - EXTRACTION DE L'ADN VIRAL

4.1- Dissection des ovaires

On place une femelle dans une goutte de sérum physiologique (NaCl 0,7 %), puis on tire sur l'aiguillon à l'aide de pinces très fines (Moria droites ultrafines n° 5). L'appareil génital vient généralement d'un bloc. On enlève ensuite les glandes accessoires et autres pièces génitales pour ne conserver que les ovaires mêmes.

Ces ovaires sont déposés au fond d'un microtube Eppendorf de 1,5 ml, dans le plus petit volume possible de sérum (quelques μ l), afin de ne pas dégrader les tissus lors du stockage au congélateur (- 24 °C suffisent car on s'intéresse seulement à l'ADN).

4.2 - Extraction

Dans le cas d'échantillons congelés la chaîne du froid ne doit pas être rompue jusqu'à l'adjonction du liquide d'extraction, lui-même gardé au frais. Le transfert des échantillons à partir du lieu de stockage est donc réalisé sur glace pilée, les pistons de broyage étant conservés au congélateur jusqu'à utilisation. Le dégel prématuré libère des DNases qui peuvent dégrader l'ADN viral avant qu'on ait le temps de les neutraliser lors du processus d'extraction de cet ADN.

Produits nécessaires

Ils sont tous stériles et autoclavés sauf les alcools, et la protéinase K conservée congelée :

- Tampon d'extraction : Tris 10 mM / EDTA sel disodique 2 mM, pH 9
- Solution de SDS à 2 %
- Solution de protéinase K à 20 mg/ml
- Acétate de potassium 5M
- Isopropanol pur
- Ethanol 70 %
- Eau ultra-pure stérile

Protocole d'extraction

- 1) Préparer un bain-marie à 65 °C et y faire chauffer le SDS.
- 2) Ajouter aux microtubes à échantillons 100 μ l de tampon d'extraction et broyer soigneusement (un petit système électrique est utile étant donné les dimensions des ovaires).
- 3) Rincer le piston avec 100 μ l supplémentaires de tampon.
- 4) Ajouter 200 μ l de SDS et laisser une heure à 65 °C.
- 5) Ajouter 5 μ l de protéinase K et laisser 30 min à 55 °C (on accélère la baisse de température en ajoutant un peu de glace pilée dans le bain-marie).

- 6) Enlever du bain et laisser 5 min à température ambiante.
- 7) Ajouter 160 µl d'acétate de potassium et laisser 30 min sur glace pilée.
- 8) Centrifuger 20 min à 15 000 rpm.
- 9) Transférer le surnageant dans un nouveau tube. Y ajouter un volume égal d'isopropanol et laisser précipiter 20 min.
- 10) Centrifuger 10 min à 15 000 rpm.
- 11) Eliminer le surnageant. Laver le culot avec 1 ml d'éthanol.
- 12) Centrifuger 5 min à 15 000 rpm.
- 13) Enlever le maximum d'éthanol.
- 14) Centrifuger 5 min à 15 000 rpm.
- 15) Eliminer le restant d'éthanol et faire sécher 10 min sous une lampe (à incandescence).
- 16) Resuspendre le culot d'ADN dans 10 µl d'eau stérile et laisser reposer 10 min avant utilisation ou congélation.

4.3 – Coloration au Bromure d'éthidium (BET)

Le BET se présente sous forme de cristaux roses, que l'on dissout pour former une solution stock à 10 mg/ml. Cette solution est ensuite diluée dans l'eau pour former le bain de coloration à une concentration de 1 µg/ml.

Les gels sont colorés en les plongeant 15 minutes dans ce bain de coloration. Cette étape est suivie d'une phase de décoloration où l'on trempe le gel 15 minutes encore dans un bain de rinçage (eau uniquement).

Le gel est ensuite déposé sur un transilluminateur pour la visualisation et la photographie.

Quoique non utilisé ici, il est aussi possible d'ajouter du BET directement dans la solution d'agarose (à une concentration similaire, 1 µg/ml de solution) au moment de couler les gels d'électrophorèse, ce qui offre l'intérêt de pouvoir stopper temporairement l'électrophorèse pour suivre l'avancement exact des fragments d'ADN dans le gel.

4.4 - Coloration au GelStar

4.4.1 - Caractéristiques du produit

Le GelStarTM est vendu sous forme 10 000 X (conserver à - 20 °C) par TEBU (BP 15 ; 78610 Le-Perray-en-Yvelines) (voir aussi le site du fabricant : www.bioproducts.com) – On le dilue donc à la proportion 10 µl pour 100 ml de bain de coloration, soit une concentration 10 fois inférieure à celle appliquée au BET. Le colorant en solution ainsi diluée se dégrade en quelques heures à température ambiante (et quelques jours au mieux au réfrigérateur) : il faut préparer le bain juste avant de colorer, et grouper les gels. Il est même préférable de refaire un nouveau bain à chaque fois pour assurer une coloration optimale. C'est un colorant possédant des caractéristiques similaires au SYBR Green, émettant ainsi une fluorescence verte et non pas

rose comme le BET. Il est donc préférable de l'utiliser avec des tubes spéciaux, de couleur bleu-vert, assurant une meilleure absorption de la lumière excitatrice que celle des tubes UV conventionnels.

4.4.2 - Coloration

Le gel est trempé tel quel dans le bain, après l'électrophorèse. Le colorant diffuse lentement dans les gels épais : il est préférable de fabriquer des gels d'agarose d'épaisseur égale à 6 mm, voire 4 mm seulement. Dans ce cas la coloration est effective en 30 min. La précoloration du gel avant électrophorèse est possible.

La décoloration n'est pas nécessaire, contrairement au BET : il suffit de laver la surface du gel en le trempant brièvement dans une cuve de lavage puis de le déposer sur le transilluminateur. La fluorescence verte nécessite quelques adaptations : les caméras numériques ont une compensation automatique et s'adaptent directement à cette longueur d'onde mais les Polaroids nécessitent un filtre vert adapté. Les poussières de talc se voient facilement : il faut utiliser des gants non poudrés et bien nettoyer la surface du gel.

4.4.3 – Sécurité

Ce colorant est considéré comme moins toxique que le BET, entre autres parce qu'il est plus fragile. Mais il reste un agent intercalant, et donc un mutagène probable. Il est préférable le manipuler et de le détruire dans les mêmes conditions de sécurité que le BET. Comme il est utilisé à faible concentration, il est possible de l'adsorber sur charbon actif pour réduire le volume de déchets à traiter.

STUDY OF THE BIOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND GENETIC
VARIABILITY OF POPULATIONS FROM DIFFERENT GEOGRAPHIC
ORIGINS OF *COTESIA PLUTELLAE* (KURDJUMOV)
(HYMENOPTERA : BRACONIDAE), PARASITOID OF THE
DIAMONDBACK MOTH *PLUTELLA XYLOSTELLA* (L.) (LEPIDOPTERA :
YPONOMEUTIDAE).

SUMMARY :

To optimize the use of *Cotesia plutellae* against its host *Plutella xylostella*, we analysed the variability of some populations of the parasitoid.

The biology of *P. xylostella* and control methods against this pest are described. Then the biology of *C. plutellae* is described. Interfecundity of geographically distant populations of this species (Benin, Reunion, Taiwan, South Africa and Hong-Kong) was evaluated.

Two populations of *P. xylostella* and their retinue of parasitoids in two distinct tropical areas (Brazil and Reunion Island) were surveyed. The importance of *C. plutellae* within these retinues and their efficiency in the control of the pest were evaluated.

The enzymatic polymorphism in *C. plutellae* was measured. Isoenzymatic electrophoresis provides a tool for characterizing *C. plutellae* populations and their genetic relatedness.

Evidence for diversity of the symbiotic *C. plutellae* polydnavirus was showed. The peculiar structure of the viral particle is described, the important polymorphism of the viral genome is underlined and its potential use as a tool in population studies of the wasp is proposed.

RESUME

Dans l'optique d'une optimisation de l'utilisation de *Cotesia plutellae* contre son hôte *Plutella xylostella*, nous nous sommes attachés à analyser la variabilité de populations du parasitoïde.

Dans une première partie, la biologie de *P. xylostella* est rappelée ainsi que les moyens de lutte contre ce ravageur. Est décrite ensuite la biologie de *C. plutellae* ainsi que l'étude de l'interfécondité de cinq populations géographiquement éloignées de cette espèce (originaires du Bénin, île de la Réunion, Taïwan, Afrique du Sud et Hong-Kong).

La seconde partie présente une étude de deux populations de *P. xylostella* et de leurs cortèges de parasitoïdes dans deux zones tropicales distinctes (Brésil et île de la Réunion), ainsi que l'importance de *C. plutellae* au sein de ces cortèges et leur efficacité dans le contrôle du ravageur.

La troisième partie porte sur la mise en évidence de la variabilité biochimique chez *C. plutellae* et souligne l'utilité de l'électrophorèse isoenzymatique comme outil de caractérisation des populations de cette espèce ainsi que leurs relations génétiques.

Dans une quatrième partie est décrite la caractérisation du polydnavirus symbiote de *C. plutellae*, essentiel au succès reproducteur du parasitoïde. La structure particulière des particules virales est décrite, l'important polymorphisme du génome viral est mis en évidence et son utilisation potentielle comme outil d'étude des populations de la guêpe est proposée.

DISCIPLINE (CNU)

Section 67 : Biologie des populations et Ecologie

MOTS-CLES

- *Plutella xylostella*
- *Cotesia plutellae*
- Parasitoïde
- Dynamique des populations
- Polymorphisme
- Lutte biologique
- Polydnavirus
- Brésil ; île de la Réunion

ADRESSES DES LABORATOIRES

Laboratoire de Zoogéographie
Université Paul Valéry – Montpellier III
Route de Mende
34199 Montpellier Cedex 5
et
CIRAD – AMIS/Protection des cultures
Laboratoire Entotrop – TA 40/02
Avenue d'Agropolis
34398 Montpellier Cedex 5